ISOLIERTE HEPATOZYTEN ALS MODELLSYSTEM FÜR BIOTRANSFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN

MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN EINES IN VITRO-MODELLS BEI DER UNTERSUCHUNG DES ARZNEIMITTELSTOFFWECHSELS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Thomas Kronbach
aus Königsfeld

1983

ISOLIERTE HEPATOZYTEN ALS MODELLSYSTEM FÜR BIOTRANSFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN

MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN EINES IN VITRO-MODELLS BEI DER UNTERSUCHUNG DES ARZNEIMITTELSTOFFWECHSELS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Thomas Kronbach
aus Königsfeld

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 9.3.1983

Dekan: Prof.Dr.Joachim Strähle

1. Berichterstatter: Prof.Dr.Wolfgang Voelter

2. Berichterstatter. Prof.Dr.Hanspaul Hagenmaier

Abstract

KRONBACH, Thomas

ISOLIERTE HEPATOZYTEN ALS MODELLSYSTEM FÜR BIOTRANSFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN - MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN EINES in vitro-MODELLS BEI DER UNTERSUCHUNG DES ARZNEIMITTELSTOFFWECHSELS

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit können isolierte Hepatozyten von Ratte und Maus charakterisiert werden als ein Modellsystem hoher in vitro-in vivo-Korrelation bei Phase-I-Biotransformationsreaktionen. Dieses Modellsystem macht Metabolitenstrukturen leicht zugänglich, läßt den Einfluß der Serumalbuminbindung auf die Biotransformation untersuchen und kann unterschiedliches pharmakodynamisches Verhalten erklären, wenn dieses auf Unterschieden in der Biotransformation beruht. Im Verbund mit pharmakodynamischen Untersuchungen können isolierte Hepatozyten somit zur Optimierung der pharmakologischen Wirkung eingesetzt werden.

Diese Ergebnisse werden durch Untersuchung des Metabolismus ausgewählter Fremdsubstanzen (Aminopyrin, Benzaron, N-alkylsubstituierte 4,4-Diphenylpiperidine, Lonazolac) mit Hilfe einer entwickelten hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Vorsäulentechnik erhalten, die die Probenaufarbeitung und -anreicherung in das analytische System integriert. Genauigkeit und Reproduzierbarkeit dieser Technik werden unter Beweis gestellt und die allgemeine Anwendbarkeit wird an weiteren Beispielen (Bufuralol, Naftidofuryl) demonstriert.

Als Aminopyrinmetaboliten konnten durch UV-Spektroskopie und Massenspektrometrie identifiziert werden: 4-Methylaminoantipyrin, 4-Aminoantipyrin, 4-Formylaminoantipyrin, 4-Acetylaminoantipyrin, 3-Hydroxymethylaminopyrin, 3-Hydroxymethyl-4- methylaminoantipyrin und 2-Hydroxymethylaminopyrin. 2-Hydroxymethylaminopyrin wird erstmals als Metabolit von Aminopyrin beschrieben.

Die Untersuchung der Biotransformation von Benzaron führt zu vier erstmals beschriebenen monohydroxylierten Metaboliten.

Der Effekt der Serumalbuminbindung von Lonazolac auf die Biotransformation in Hepatozyten läßt den "first pass effect" abschätzen; die rezirkulierend perfundierte Leber liefert hier keine derartige eindeutigen Ergebnisse.

Vergleichende Untersuchungen an Rattenhepatozyten führen das überlegene pharmakodynamische Verhalten von Budipin auf gegenüber homologen 4,4-Diphenylpiperidinen quantitativ und qualitativ unterschiedliche Biotransformation zurück.

Diese Arbeit entstand von Februar 1981 bis Dezember 1982 in der Abteilung für Physikalische Biochemie des Instituts für Physiologische Chemie der Univerität Tübingen und in Teilen in den Forschungslaboratorien der Byk Gulden Lomberg GmbH, Konstanz, unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Voelter.

Herrn Professor Dr. W. Voelter danke ich für die interessante Themenstellung, sein stetes Interesse und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Der Firmenleitung der Byk Gulden Lomberg, Chemische Fabrik GmbH, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes, die Unterstützung durch Sachmittel und für ein Stipendium.

INHALTSVERZEICHNIS:

	Abkürzungen	1
1.	EINLEITUNG	2
2.	PROBLEMSTELLUNG	3
3.	ALLGEMEINES	4
3.1	Biochemische Aspekte	4
3.1.1	Biotransformation von Fremdsubstanzen	4
3.1.1.1	Funktionalisierungsreaktionen	4
3.1.1.1.1	Polysubstratmonooxygenase (PSMO) - gekoppelte Biotransformationssysteme der Leber	5
3.1.1.1.2	Andere Funktionalisierungsreaktionen	10
3.1.1.2	Konjugationsreaktionen	13
3.1.1.3	Interaktion der Biotransformationssysteme und Faktoren, die die Biotransformation beeinflussen	16
3.1.2	In vitro-Modellsysteme zur Untersuchung von Biotransformationsreaktionen	18
3.1.2.1	Mikrosomenfraktionen	19
3.1.2.2	Gewebeschnitte	20
3.1.2.3	Perfundierte Leber	21
3.1.2.4	Isolierte Hepatozyten	22
3.1.2.5	Hepatozytenprimärkulturen	23
3.1.3	Biotransformation von Aminopyrin	24
3.2	Analytische Aspekte	30
4.	ERGEBNISSE	32
4.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Analyse der Xenobiotika und ihrer Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten	32
4.1.1	Trennsysteme für Aminopyrin und Metaboliten	33
4.1.2	Trennsysteme für N-alkylsubstituierte Diphenylpiperidine und Metaboliten	35
4.2	HPLC-Vorsäulentechnik zur direkten Analytik von Xenobiotika und ihren Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten	39
4.2.1	Anwendungsbeispiele für die Vorsäulentechnik	43
4.3	In vitro- und in vivo-Biotransformation von Aminopyrin bei Ratte, Maus und Meerschweinchen	48
4.3.1	Strukturaufklärung der Aminopyrin-Metaboliten	52

4.3.2 Biotransformation von Aminopyrin durch Humanmikrosomen 65
4.4 In vitro-Biotransformation von Lonazolac 66
4.5 Biotransformation von Benzaron in der Ratte 69
4.6 Biotransformation N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine durch isolierte Rattenhepatozyten 76
5. DISKUSSION 81
5.1 Isolierte Hepatozyten von Ratte, Maus und Meerschweinchen als Modellsystem für die in vivo-Biotransformation von Aminopyrin 81
5.2 Effekt der Serumalbuminbindung auf die Biotransformation von Lonazolac in isolierten Hepatozyten und rezirkulierend perfundierter Leber der Ratte 87
5.3 Biotransformation von Benzaron in der Ratte 88
5.4 Biotransformation N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine durch Rattenhepatozyten 89
5.5 Anwendungsmöglichkeiten und -grenzen isolierter Hepatozyten bei Biotransfomationsuntersuchungen.. 90
6. EXPERIMENTELLES 92
6.1 Chemikalien, Tiere, Inkubationsmedien, chromatographische Eluenten 92
6.2 Geräte 93
6.2.1 Zellpräparation 93
6.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) . 94
6.2.3 Gaschromatographie 96
6.2.4 Integration und Datenverarbeitung 97
6.2.5 Massenspektrometrie 97
6.3 Präparation von Hepatozytensuspensionen von Ratte, Maus und Meerschweinchen 97
6.4 Festlegung der Inkubationskonzentrationen mittels Glukoneogenese 98
7. ANHANG 101
7.1 Typische Größenverteilung isolierter Rattenhepatozyten 103
7.2 UV-Spektren und Chromatogramme 105
8. ZUSAMMENFASSUNG 137
9. LITERATUR 139

Abkürzungen

Strukturen für Aminopyrin und seine Metaboliten, sowie deren verwendete Abkürzungen finden sich in Abbildung 3 (Kapitel 3.1.3).

Acetyl-CoA	acetyliertes Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
C_8	RP-HPLC-Trennmaterial mit gebundenen Oktylgruppen
C_{18}	RP-HPLC-Trennmaterial mit gebundenen Oktadecyl-gruppen
CoA-SH	Coenzym A
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid (Riboflavin-5'-phosphat)
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
3-MC	3-Methylcholanthren
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
PB	Phenobarbital (5-Phenyl-5-ethyl-barbitursäure)
PIC	Ionenpaarchromatographie (paired ion chromato-graphy)
PSMO	Polysubstratmonooxygenase, Trivialname: Cyto-chrom P-450
SAS	RP-Trennmaterial mit gebundenen C_2-, C_4-, C_6-Alkylresten
SKF-525A	2-Diethylaminoethyl-2,2-di-phenylvalerat x HCl
UDP	Uridindiphosphat
UDPGA	Uridindiphosphat-Glucuronsäure
UTP	Uridintriphosphat

1. EINLEITUNG

Täglich gelangt eine unübersehbare Zahl von Fremdsubstanzen (Xenobiotika) über den Gastrointestinaltrakt, die Lunge oder die Haut in den menschlichen Organismus. Nach Absorption regeln Distribution, Biotransformation und Exkretion die Verweildauer dieser Substanzen im Körper und einzelnen Kompartimenten. Diese Regulationsmechanismen sind insbesondere bei bioaktiven Xenobiotika von Bedeutung, da sie die pharmakologische bzw. toxische Wirkung steuern. Während Absorption, Distribution und Exkretion wesentlich von physikochemischen Parametern wie Verteilungskoeffizient, pK-Wert etc. bestimmt sind und damit in einfachen Modellen untersucht werden können, liefert die überwiegend in der Leber stattfindende Biotransformation durch Funktionalisierungs- und Konjugationsreaktionen Verbindungen (Metabolite) mit veränderten physikochemischen und pharmakologischen bzw. toxikologischen Eigenschaften. Ausmaß und Art der Metabolisierung eines Xenobiotikums sind mit den heute zur Verfügung stehenden Mitteln nur in einfachsten Fällen vorhersagbar, da die biotransformierenden Enzyme bzw. Enzymketten bislang bezüglich Substratspezifität, Multiplizität, Struktur und Wirkungsmechanismus zu wenig charakterisiert sind. Um dennoch Aussagen zur hepatischen Biotransformation machen zu können, bedarf es der Entwicklung und Charakterisierung biologischer Modellsysteme, die möglichst viele der notwendigen Komponenten enthalten.

2. PROBLEMSTELLUNG

Die in der Diplomarbeit erhaltenen Ergebnisse zur Biotransformation von Pharmaka in isolierten Hepatozyten dokumentieren die Kompetenz dieses Modellsystems, Biotransformationsreaktionen analog zu den in vivo auftretenden zu simulieren. In dieser Arbeit sollen anhand von Modellverbindungen wie Aminopyrin, Lonazolac, Benzaron und N-alkylsubstituierten 4,4-Diphenylpiperidinen Möglichkeiten und Grenzen der Anwendbarkeit dieses Modellsystems aufgezeigt werden. Die Arbeitshypothese hierfür war:

> "Die vitale, isolierte Leberparenchymzelle ist die kleinste biologische Einheit, die die Biotransformation von Fremdsubstanzen in der ganzen in vivo auftretenden Vielfalt simulieren kann.Hepatozytensuspensionen stellen außerdem Metaboliten in zur Strukturaufklärung ausreichenden Mengen zur Verfügung."

Die Arbeit soll qualitative und quantitative Aspekte einschließen und für die Analytik der Biotransformationsprodukte leistungsfähige chromatographische und spektroskopische Methoden verwenden. Der Schwerpunkt soll bei der in vitro- und in vivo-Biotransformation von Aminopyrin liegen, um die Ergebnisse mit den vielfältigen publizierten Arbeiten auf diesem Gebiet vergleichen zu können.

3. ALLGEMEINES

3.1 Biochemische Aspekte

3.1.1 Biotransformation von Fremdsubstanzen

Einige Fremdsubstanzen können den Körper in unveränderter Form passieren, doch wird deren überwiegende Zahl - hauptsächlich in der Leber - biotransformiert. Zweck der evolutionären Entwicklung von Biotransformationssystemen ist die Umwandlung der Fremdsubstanzen zu hydrophileren und damit leichter ausscheidbaren Metaboliten. Die hierbei aktiven Enzymsysteme liefern in einzelnen Fällen Metabolite - meist als reaktive Zwischenprodukte - die toxisch, carcinogen oder teratogen sind. Die Biotransformation erweist sich daher für die Inaktivierung der meisten Xenobiotika als probates Mittel, doch kann sie nicht allgemein als Entgiftungsmechanismus verstanden werden.

Biotranformation verläuft über Funktionalisierung und/oder Konjugation der Fremdsubstanzen. Die zugrundeliegenden Enzymsysteme und deren Mechanismen werden teils noch unzureichend verstanden, sind Gegenstand intensiver Untersuchungen und sollen daher vom heutigen Wissensstand aus kurz dargestellt werden.

3.1.1.1 Funktionalisierungsreaktionen

Funktionalisierungsreaktionen verlaufen oxidativ [15, 3, 6-10], reduktiv oder unter Erhalt der Oxidationsstufe (Hydrolyse) [1]. Quantitativ dominieren Oxidationsreaktionen, die durch gekoppelte Enzymsysteme katalysiert werden, deren terminales Enzym - eine Polysubstratmonooxygenase (PSMO) ein Sauerstoffatom auf das Substrat überträgt.

Die Leber stellt das zentrale Organ der Biotransformation dar. Die wichtigsten Enzyme hierfür sind innerhalb der Leberzellen überwiegend an der Membran des glatten, endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert. Sie sind damit Teil eines Netzwerks, das für eine Reihe von wesentlichen Funktionen im Intermediärstoffwechsel verantwortlich ist: Regulation von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, Biosynthese von Cholesterol, Steroidhormonen und Glykoproteinen [2].

3.1.1.1.1 Polysubstratmonooxygenase (PSMO) - gekoppelte Biotransformationssysteme der Leber

Außer den terminalen Monooxygenasen sind NADPH-PSMO-Reduktase, Cytochrom b_5, Cytochrom b_5-Reduktase und die mikrosomale Membran Bestandteile dieses Biotransformationssystems, deren Zusammenwirken schematisch in Abbildung 1 dargestellt ist.

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, stellt die reaktive Spezies ein Sauerstoffatom dar [12], welches durch Insertion oder nach Protonenabstraktion mit dem Substrat reagiert. Diese Enzymreaktion verläuft, im Gegensatz zur Metabolisierung endogener Verbindungen, nicht über die Aktivierung des Substrates und liefert so die Grundlage zur Umsetzung einer unübersehbaren Zahl von Fremdsubstanzen.

Engogene Verbindungen werden mit Geschwindigkeitskonstanten von 10^7 bis 10^9 $mol^{-1}sec^{-1}$ umgesetzt und stellen damit diffusionskontrollierte Reaktionen dar, bei denen nahezu jede Kollision zur Reaktion führt [11]. Demgegenüber stehen bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten für Polysubstratmonooxygenasekatalysierte Oxidationen im Bereich von 10^0 bis 10^3 mol^{-1} sec^{-1}. Der Vorteil niedriger Substratselektivität wird also durch die Verlangsamung der Umsetzung erkauft.

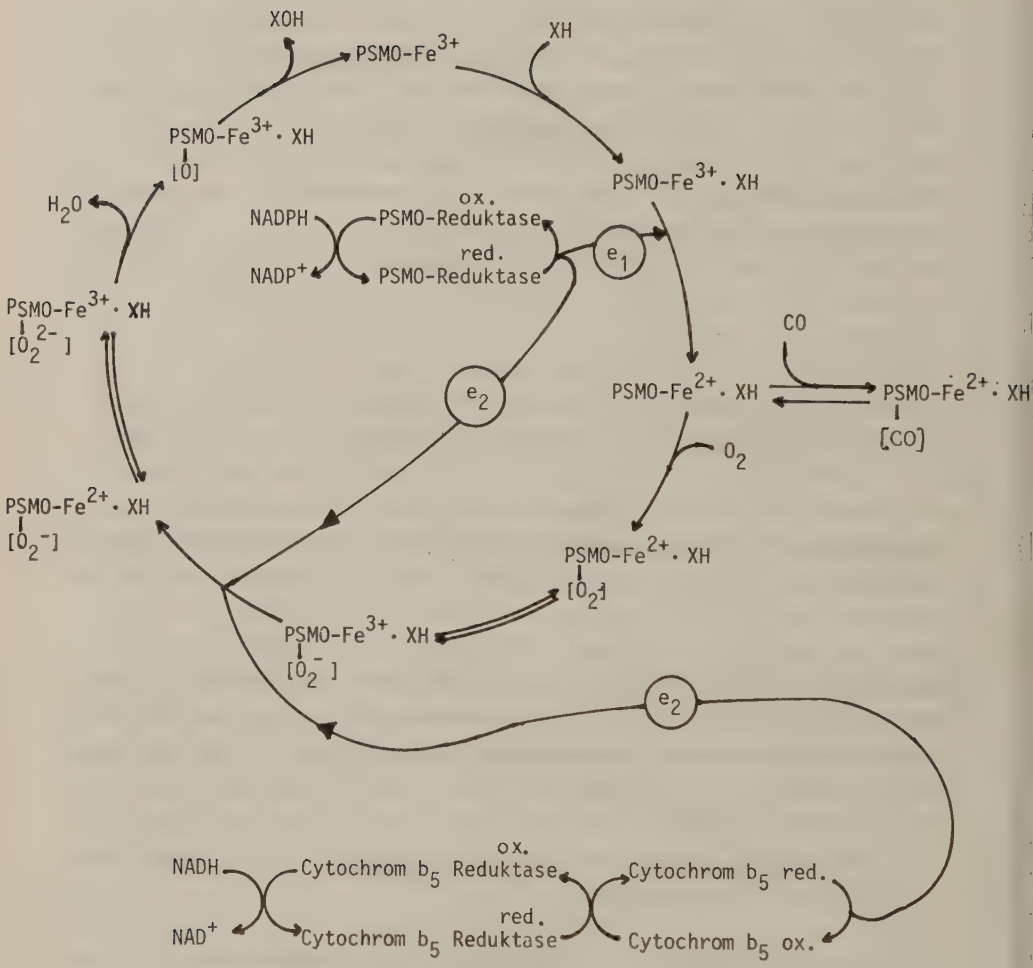


Abbildung 1: Schematische Darstellung der oxidativen Biotransformation von Fremdsubstanzen durch Polysubstratmonooxygenase-gekoppelte Reaktionen. XH = Substrat, PSMO-Fe = Polysubstratmonooxygenase. Das erste Elektron (e1) wird durch die NADPH-Reduktase übertragen, die auch das zweite Elektron (e2) für die Reaktion zur Verfügung stellen kann, welches jedoch überwiegend über den Cytochrom b_5-Weg bereitgestellt wird.

Wie bereits erwähnt, repräsentiert "Cytochrom P-450" eine Enzymfamilie [12] der b-Cytochrome. Tabelle 1 zeigt Faktoren, an denen sich die Multiplizität dieser Enzyme manifestiert.

Tabelle 1: Multiplizität der Polysubstratmonooxygenasen

	Literatur
Spezies-, geschlechts- und altersabhängige Biotransformation	(13)
Spezifische Induktion bzw. Inhibition durch Fremdsubstanzen	(14-41)
Unterschiedliche Reaktionskinetik	(13, 21, 42-57)
Unterschiedliche Stereoselektivität	(58-63),
Unterschiedliche Ethylisocyanid-Bindungsspektren	(13, 42, 64, 65),
Unterschiedliche Halbwertszeiten des Häm-Anteils	(66-69),
Unterschiedliche Stabilität gegen Lipidperoxide, Lipasen etc.	(70-78),
Unterschiedliche Stabilität des Häm-Anteils gegen Allylisopropylacetamid und Fluroxen	(79-82),
Unterschiedliche Bindungsfähigkeit für Sauerstoff	(83-86),
Unterschiedliche ESR- und UV-Substratbindungsspektren	(32, 62, 87-91)
Unterschiedliche Aktivitäten nach Isolierung und Rekonstruktion	(92-117).

Die chemische Zusammensetzung dieser Polysubstratmonooxygenase ist heute noch Gegenstand intensiver Untersuchungen und wird dadurch erschwert, daß elektrophoretisch einheitliche Produkte immunologisch unterschiedliche Formen beinhalten [118, 119]. Eine Enzympräparation, die höchstwahrscheinlich einheitlich ist, ist die Hauptkomponente des durch Phenobarbital induzierten Cytochrom P-450 von Kaninchenlebermikrosomen, P-450 LM_2 [120].

Jedes Molekül des reinsten Cytochrom P-450 LM_2 und P-450 LM_4, wie es von Coon und Mitarbeitern isoliert wurde, enthält ein Molekül Häm, drei Kohlenhydratreste (Glukosamin, Mannose und Glukose) und nur etwa 0.4 Moleküle Phospholipid pro Molekül Protein [102]. Die Molekulargewichte liegen im Bereich von 47 000 bis 56 000 je nach Art des untersuchten Materials, mit 397 bis 487 Aminosäuren in der Peptidkette [121].

Als weiteres Enzym ist die NADPH-PSMO-Reduktase bei Biotransformationen (siehe Abbildung 1) aktiv, deren prosthetische Gruppe je ein Molekül FMN (Flavinmononucleotid = Riboflavin-5'-phosphat) und FAD (Flavin-adenin-dinucleotid) enthält [122], deren Molekulargewicht bei Rattenleberpräparationen zwischen 76 000 und 79 000 liegt [123-125] und die 673 - 711 Aminosäuren enthält [124, 125].

NADPH-PSMO-Reduktasen aus Mitochondrien und Bakterien unterscheiden sich von mikrosomaler NADPH-PSMO-Reduktase dadurch, daß sie nur FAD enthalten und Elektronen nur indirekt über Eisen-Schwefel-Proteine auf Polysubstratmonooxygenase übertragen können. Diese Ähnlichkeit im Elektronenübertragungsmechanismus ist in Hinsicht auf die Hypothese des bakteriellen, symbiotischen Ursprungs der Mitochondrien von besonderem Interesse [126].

Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5-Reduktase*) können ebenfalls als Elektronendonatoren fungieren. Cytochrom b_5 enthält im Gegensatz zur Polysubstratmonooxygenase den Häm-Anteil nicht kovalent gebunden, da dieser sauer extrahierbar ist und das so erhaltene Enzym durch Häm-Zugabe wieder rekonstituiert werden kann. Die Röntgenstrukturanalyse von Mathews und Strittmatter [127] aus isolierten Kalbslebermikrosomen zeigt, daß das Häm im Zentrum eines Zylinders auch 93 Aminosäuren (Durchmesser ca. 430 pm, Höhe ca. 370 pm) koordinativ an zwei Histidinmole-

*) Weitere Einzelheiten über Cytochrom b_5 finden sich in Übersichtsartikeln [128, 131-133].

küle gebunden ist. Das gesamte intakte Molekül enthält 141 Aminosäuren [128], wurde erstmals von Ho und Sato isoliert [129] und ist wie Polysubstratmonooxygenase ein membranständiges Enzym, dessen Haftung durch ein hydrophobes Peptidende [130] bewirkt wird. Wie NADPH-PSMO-Reduktase und Cytochrom b_5 besteht die NADH-cytochrom-b_5-Reduktase aus einem hydrophilen Teil, der das katalytische Zentrum trägt (MG ca. 33 000), und einem hydrophoben Ende, welches für die Verankerung in der mikrosomalen Membran verantwortlich ist. Aufgrund der Aminosäureanalyse kann ein Molekulargewicht von etwa 43 000 Dalton angenommen werden [134, 135] (andere Autoren 33 000 [136]). Die Reaktivität der isolierten Reduktase wird durch Triton X-100 und mikrosomale Phospholipide wesentlich erhöht, die hier vermutlich die Rolle der Plasmamembran beim Elektronentransfer auf Cytochrom b_5 simulieren.

Die mikrosomale Membran ist ein weiterer essentieller Bestandteil des bei der Biotransformation aktiven gekoppelten Enzymsystems, deren Rolle heute noch nicht voll verstanden wird. Vermutlich dient sie dazu, den Kontakt der einzelnen Enzyme durch hydrophobe Wechselwirkungen zu ermöglichen und die lokale Konzentration an Cytochrom P-450 zu erhöhen, jedoch gibt es Hinweise auf geordnete Strukturen innerhalb von Membranunterabschnitten, die auf eine mögliche Clusterbildung der Enzyme hindeuten. Verschiedene Cytochrom-P-450-Spezies sind räumlich unterschiedlich auf der Membran verteilt, was durch Subfraktionierung von Mikrosomen gezeigt werden kann [137], und homogene Cluster in verschiedenen Teilen des endoplasmatischen Retikulums wahrscheinlich macht.

Die Interaktion der Komponenten des Polysubstratmonooxygenase-Systems ist komplex und in Teilen umstritten. Es kann jedoch als gesichert angesehen werden, daß das erste Elektron (e1 in Abbildung 1) von der NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase geliefert wird, während das zweite Elektron (e2) hauptsächlich über das NADH-Cytochrom b_5-Reduktase-Cytochrom b_5-System übertragen wird [138], worauf auch immunchemische Untersuchungen hinweisen [139].

3.1.1.1.2 Andere Funktionalisierungsreaktionen

Neben den Polysubstratmonooxygenase-abhängigen Reaktionen sind weitere Enzymsysteme in der Leber an Funktionalisierungsreaktionen beteiligt.

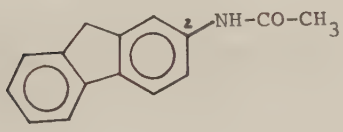
Nitro-Reduktasen kommen hauptsächlich membranständig, aber auch zytosolisch vor [140-142]; sie sind NADPH- und NADH-abhängig, besitzen aber von den Polysubstratmonooxygenasen abweichende Eigenschaften und Mechanismen, die in einigen Übersichtsartikeln beschrieben wurden [143-145]. Der Mechanismus verläuft anaerob über Nitroso- und Hydroxylamin-Zwischenstufen [146, 147], wobei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Bildung des Nitroso-Derivates ist [145]. Die mikrosomale(n) Reduktase(n) ist (sind) NADPH-abhängig, sauerstoffempfindlich und durch PB und 3MC induzierbar, während die zytosolische Fraktion NADH-abhängig, sauerstoffunempfindlich und durch PB und 3MC nicht induzierbar ist. Da Nitro-Reduktionen CO-empfindlich sind, scheint bei ihnen auch eine Polysubstratmonooxygenase involviert zu sein.

Azo-Reduktasen bestehen wahrscheinlich aus mindestens vier voneinander unabhängigen Enzymsystemen, die an der Membran des ER lokalisiert sind [1]:

1. CO sensitives Polysubstramonooxygenase-System, nicht solubilisierbar
2. NADPH-Cytochrom c-Reduktase, CO-unempfindlich, solubilisierbar
3. 3MC induzierbares Enzymsystem, CO unempfindlich, solubilisierbar
4. Enzymsystem, in dem NADH-Cytochrom-b_5-Reduktase beteiligt ist

Die Azo-Reduktion über Polysubstratmonooxygenase scheint allgemein von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Mikrosomale N-Oxidasen wurden in einer Reihe von Übersichtsartikeln beschrieben [148-153]; sie sind NADPH- und sauerstoffabhängige Monooxygenasen, die oft nicht durch CO, SKF-525A und andere Polysubstratmonooxygenase-Inhibitoren beeinflußt werden. Die N-Oxidation von Anilin und p-Chloranilin wird jedoch durch SKF-525A inhibiert, und diejenige von 2-Acetylaminofluoren ist gegenüber Kobaltchlorid und CO empfindlich. Dies läßt auf mindestens zwei N-Oxidase-Systeme schließen [153]:



2-Acetylaminofluoren

1. Polysubstratmonooxygenase,
2. Polysubstramonooxygenase-unabhängige Monooxygenase (ein Flavoprotein, NADPH- und sauerstoffabhängig; prosthetische Gruppe: FAD; kein Cytochrom; ohne Eisen und Kupfer).

Während nichtbasische Amine über das erste Enzymsystem oxidiert werden, werden basische Amine wie z.B. Nicotin über Weg 2 verstoffwechselt. Diese pK-Abhängigkeit kann bei leicht basischen Aminen zur Bildung derselben Biotransformationsprodukte auf verschiedenen Wegen führen. Bei der Polysubstratmonooxygenase scheint es sich aufgrund von Induktionsexperimenten um eine andere Spezies als bei der C-Oxidation zu handeln.

Eine mikrosomale NADH-Hydroxylamin-Reduktase reduziert Hydroxylamine zum entsprechenden Amin, während eine NADPH- und sauerstoffabhängige Oxidase Hydroxylamine zu Nitronen umsetzten kann [154]. Beide Enzyme werden durch CO nicht inhibiert.

Die N-Demethylierung von Hydrazinen verläuft in nichtinduzierten Mikrosomen über einen Polysubstratmonooxygenase-unabhängigen Weg, während die Demethylierung in PB-induzierten Mikrosomen über eine Polysubstratmonooxygenase verläuft [155].

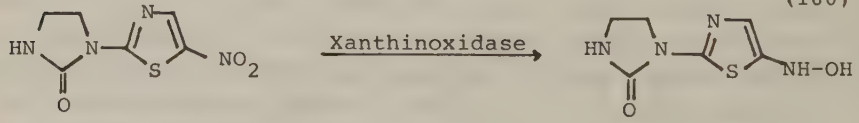
Auch andere Zellkomponenten als das endoplasmatische Retikulum können Fremdsubstanzen umsetzen [156, 157]; so enthält das

Zytosol eine Reihe von Oxidationsreduktasen wie die Alkoholdehydrogenase, die Indanoloxidase (NADP-abhängig mit hoher Substratspezifität), welche aus Rinderleber isoliert wurde [159], und eine NADPH-abhängige Reduktase, die für die Reduktion von Metyrapon verantwortlich ist und für deren Funktion die Carbonylfunktion im Substratmolekül von essentieller Bedeutung ist [159]:

Metyrapon

Als weitere lösliche Enzyme seien die Molybdoflavoproteinaldehydoxidase und die Xanthinoxidase genannt, die z.B. Salicylaldehyd und Benzaldehyd zu den entsprechenden Carbonsäuren oxidieren [156],

(160)



Niridazol

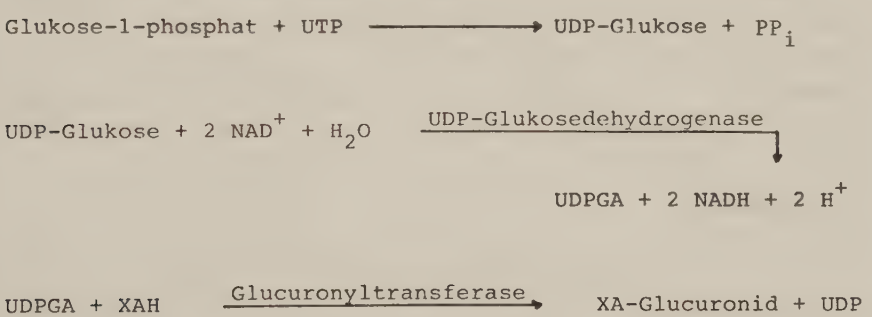
und eine NAD-spezifische Aldehydreduktase hoher Substratselektivität, die Chloralhydrat zu Trichloressigsäure oxidiert [156].

In den Mitochondrien erfolgt die Desaminierung aryl- und alkylsubstituierter aliphatischer Amine durch Mono- und Diaminoxidasen, sowie die Aromatisierung von Cyclohexancarbonsäuren [156] durch ein ATP-, Coenzym A- und FAD-abhängiges Enzymsystem, welches nicht mit dem sauerstoff- und NADPH-abhängigen System der Steroidaromatisierung identisch ist [156].

3.1.1.2 Konjugationsreaktionen

Konjugationsreaktionen (Phase-II-Reaktionen) führen durch Reaktion - meist in der Phase I entstandener - funktioneller Gruppen mit Verbindungen des Intermediärstoffwechsels zu Metaboliten mit überwiegend hoher Hydrophilie. Im Gegensatz zu Funktionalisierungsreaktionen via Polysubstrat-Monooxygenase, bei denen Sauerstoff aktiviert und übertragen wird, reagiert hier die aktivierte endogene Verbindung mit der funktionellen Gruppe. Da Konjugationsreaktionen in der vorliegenden Arbeit nur am Rande untersucht wurden, sollen sie an dieser Stelle nur summarisch dargestellt werden.

Glucuronidierung



(A ist Teil der Acceptorgruppe z.B.: O, COO, NH, S).

Vögel, Säugetiere [161], Reptilien [162] und Amphibien [161, 163] können Fremdsubstanzen glucuronidieren. Unter den Säugern haben Katzen diese Fähigkeit nicht [164], hier dominieren andere Konjugationsarten [165], obwohl endogene Verbindungen wie Bilirubin und einige Steroide in diesen Spezies als Glucuronide ausgeschieden werden [166, 167].

Sulfat-Konjugation

$ATP + SO_4^{2-} \xrightarrow{\text{ATP-Sulfurylase}}$ Adenosin-5'-phosphosulfat(APS) + PP_i

$ATP + APS \xrightarrow{\text{APS-Phosphokinase}}$ 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat(PAPS) + ADP

$PAPS + XAH \xrightarrow{\text{Sulfontransferase}}$ $XA\text{-}SO_3H$ + 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat (PAP)

(A ist Teil der Acceptorgruppe, z.B.: O, NH).

Im Tierreich sind Sulfotransferasen weit verbreitet, so werden Phenole zu Schwefelsäureestern konjugiert in Säugern [168, 170], Vögeln [170, 171], Reptilien [162, 170], Amphibien [161], Insekten [170, 172] und Mollusken [170, 173, 174].

Amidsynthese

$R\text{-}COOH + ATP \xrightarrow{\text{Acylsynthetase}}$ $R\text{-}CO\text{-}AMP + PP_i$

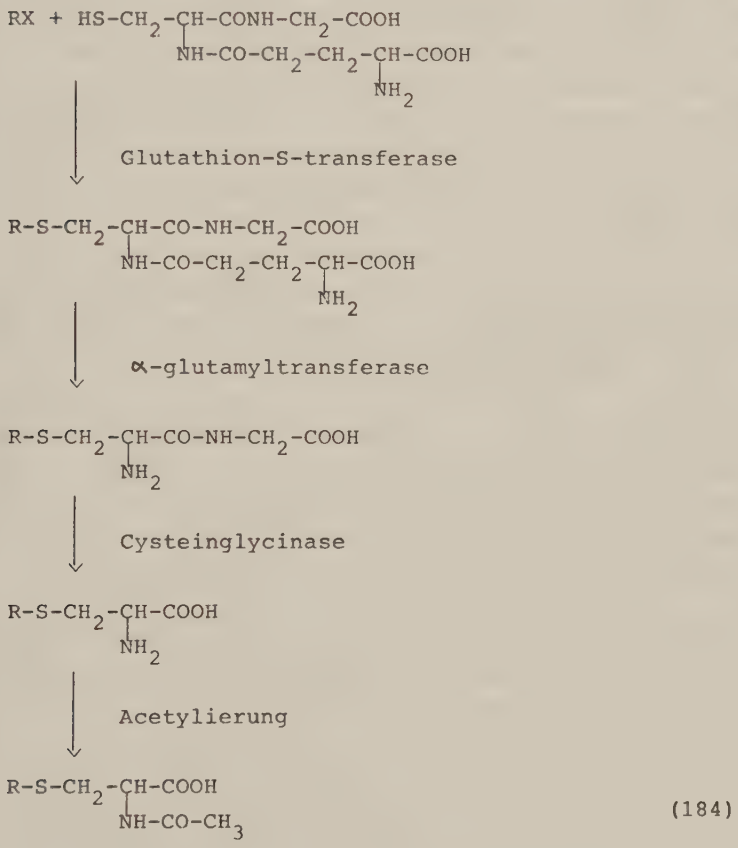
$R\text{-}CO\text{-}AMP + CoA\text{-}SH \xrightarrow{\text{Acylthiokinase}}$ $R\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + AMP$

$R\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + X\text{-}NH_2 \xrightarrow{\text{Transacylase}}$ $R\text{-}CO\text{-}NHX + CoA\text{-}SH$

Der Aktivierungsmechanismus über CoA wurde bei der Untersuchung der Sulfanilamid-acetylierung entdeckt [175]. Dieser Mechanismus führt zur Acylierung von exogenen Aminen bzw. zur Konjugation exogener Carbonsäuren mit endogenem Glycin [170], Glutamin [176-180], Ornithin [181] oder Taurin [182, 183].

Mercaptursäure-Konjugate

N-Acetylcystein-Konjugate (Mercaptursäuren) werden von halogenierten Nitrobenzolen und Epoxiden polycyclischer Kohlenwasserstoffe gebildet.



(184)

Zunächst werden die Substrate durch Glutathion-S-transferasen konjugiert, die terminalen Aminosäuren enzymatisch abgespalten und die Cystein-Derivate nach dem oben beschriebenen Mechanismus durch Acetyl-CoA acetyliert.

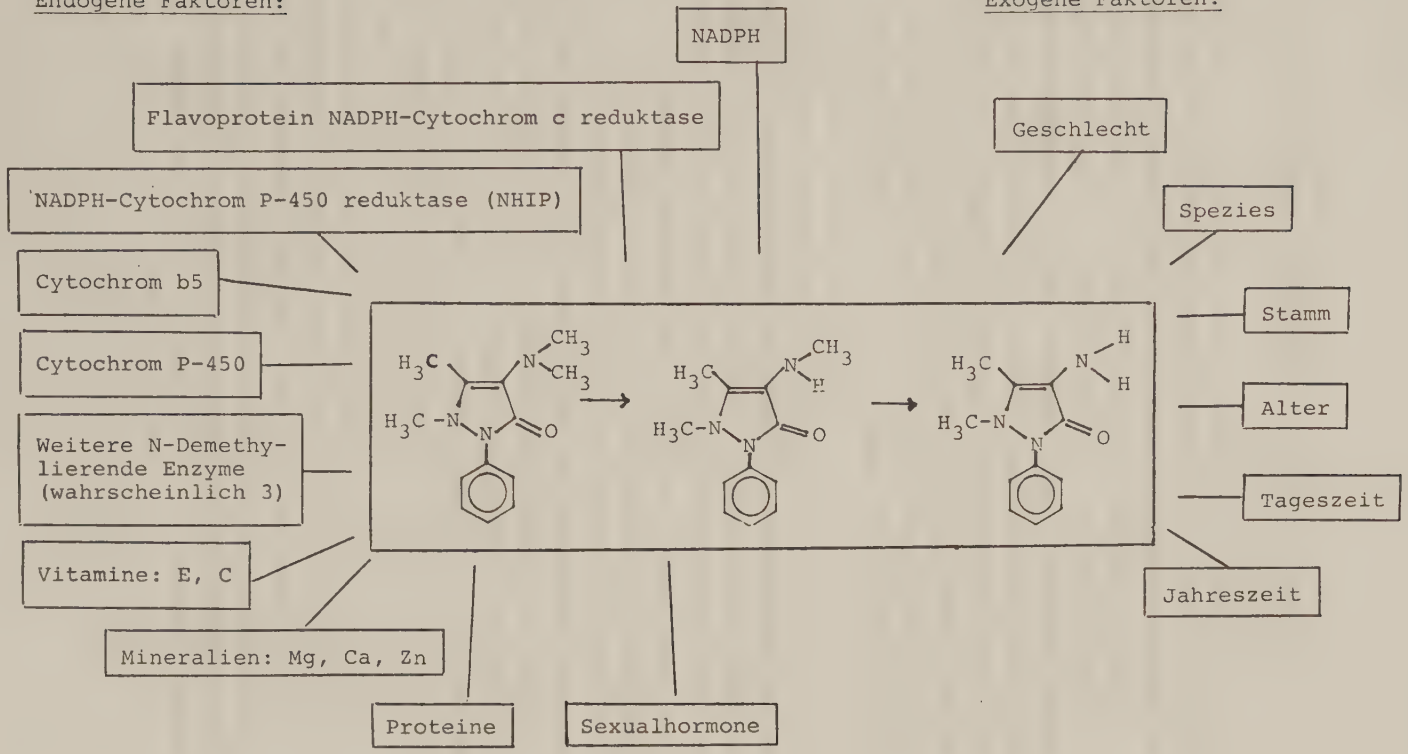
3.1.1.3 Interaktion der Biotransformationssysteme und Faktoren, die die Biotransformation beeinflussen

Aufgrund der weiten Substratselektivität und der Vielfalt biotransformierender Enzyme, die für Fremdsubstanzen mit einer Reihe von Angriffsstellen zur Verfügung stehen, entspricht die Voraussage der Biotransformation dieser Substanzen der Entscheidungsfindung in einem Netzwerk, für dessen determinierende Faktoren weit weniger Gleichungssysteme gefunden werden können als Faktoren vorhanden sind, ja für das nicht einmal Zahl und Gewicht der Faktoren feststeht. Ferner können die entstandenen Metabolite selbst weiter biotransformiert werden und komplizieren dadurch die Verhältnisse. Ist der "Normalfall" der Biotransformation Resorption —> Funktionalisierung —> Konjugation —> Exkretion, so verlaufen wohl die meisten Biotransformationsprozesse "anormal", da oft eine Reihe von Prozessen parallel und/oder aneinandergekoppelt ablaufen.

Das beschriebene Netzwerk der Biotransformationsreaktionen wird durch eine Reihe von Faktoren reguliert, die an dieser Stelle nicht eingehend besprochen werden können. Beispielhaft hierfür soll Schema 1 stehen, welches gesicherte Faktoren aufzeigt, die die N-Demethylierung von Aminopyrin beeinflussen.

Zusätzlich dazu gelangen heute vor allem genetische Faktoren ins Blickfeld [185], die für oft drastische Biotransformationsunterschiede verantwortlich sind.

Faktoren, die die N-Demethylierung von Aminopyrin beeinflussen



3.1.2 In vitro-Modellsysteme zur Untersuchung von Biotransformationsreaktionen

Untersuchungen an lebenden Tieren und Menschen sind das Mittel zur Feststellung des biologischen Schicksals von Xenobiotika, was Absorption, Metabolismus, Verteilung und Ausscheidung betrifft. Handelt es sich um Pharmaka, sind Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit notwendige Voraussetzungen für eine gezielte Chemotherapie. Dieser experimentelle Zugang, gleichfalls anwendbar bei Lebensmittelzusätzen und Kosmetika, wird häufig benutzt, was sich in der zahllosen Literatur zur Biotransformation von Xenobiotika in lebenden Tieren und Menschen widerspiegelt.

Es ist jedoch unerläßlich, vor Humanuntersuchungen vollständige und genaue Informationen aus Tierversuchen über Metabolismus und Toxizität der zu untersuchenden Verbindungen zu besitzen. Das beste Verständnis über Bioaktivierung und Entgiftung von Xenobiotika und über Faktoren, die diese beeinflussen, kann durch Untersuchungen an intakten Organen oder Zellpräparationen erhalten werden. Auch im Fall toxischer oder carcinogener Chemikalien, bei denen menschliche Exposition nicht vertretbar ist, kann die Abschätzung menschlicher Risiken durch in vitro-Studien aussagekräftiger gemacht werden. Die experimentellen Zugänge, die zu Biotransformationsuntersuchungen angewandt werden können, sollen im folgenden kurz beschrieben werden. Da die Leber das Organ ist, das überwiegend bei der Biotransformation von Fremdsubstanzen involviert ist, soll hauptsächlich auf den hepatischen Metabolismus eingegangen werden. Dies mindert nicht die Rolle anderer Organe und Gewebe bei der Biotransformation von Xenobiotika, und die Techniken zur Untersuchung des hepatischen Metabolismus sind gleichfalls auf andere Organe anwendbar.

Zur Untersuchung der Biotransformation unter dem Aspekt der Übertragbarkeit von in vitro-Untersuchungen auf in vivo-Verhältnisse steht die Frage der in vitro-in vivo-Korrelation im Vordergrund.

3.1.2.1 Mikrosomenfraktionen

Aus Gewebehomogenisaten gewonnene Mikrosomenfraktionen sind ein Modellsystem leichter Präparierbarkeit, mit dem optimale Inkubationsbedingungen leicht aufgefunden werden können und das leicht auf andere Organe und Spezies übertragbar ist.

Mikrosomenfraktionen werden daher bei einer immensen Zahl von Arbeiten zur Untersuchung besonders mechanistischer Apekte der Biotransformation eingesetzt. Bei der Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf die in vivo-Metabolisierung müssen jedoch die Einschränkungen, denen dieses Modellsystem unterliegt, beachtet werden:

- Die Freisetzung lysosomaler Enzyme bei der Homogenisierung kann die biochemischen Eigenschaften des Homogenates durch Zerstörung von Membranfragmenten und Co-Faktoren verändern. Die Homogenisierung kann durch das benutzte Medium bestimmte Enzyme aktivieren oder blockieren [186].

- Die Cofaktorkonzentrationen werden nur für die zu untersuchenden Enzyme optimiert und entsprechen normalerweise nicht denen der intakten Zelle. Dies kann zum Schluß auf bestimmte Hauptmetaboliten führen, die in vivo nur von untergeordneter Bedeutung sind. Ein Beispiel hierfür bieten die extrem hohen Cofaktorkonzentrationen bei Nitroreduktaseversuchen.

- Der Metabolismus von Fremdsubstanzen im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen kann wesentlich über die mitochondriale Kontrolle der Cofaktoren gesteuert werden [187]. Diese Kontrollmechanismen finden in isolierten mikrosomalen Fraktionen nicht statt. Daher können hier falsche Schlüsse gezogen werden, wenn die untersuchten Verbindungen mit den Mitochondrien in Wechselwirkung treten.

- Subzelluläre Fraktionen zeigen nicht das integrale zelluläre Biotransformationsmuster, wenn dieses in vivo durch die Kooperation verschiedener Organellen zustande kommt, wie es beispielsweise beim Imipramin-Metabolismus der Fall ist [188]; es müssen daher in diesen Fällen qualitative Unterschiede gegenüber in vivo-Verhältnissen erwartet werden.

- Die Biotransformation von Fremdsubstanzen ist abhängig von der Aufnahme der Substanz in die Zelle. Hier spielen zum Teil aktive Transportprozesse eine Rolle, die mit subzellulären Fraktionen nicht untersucht werden können.

Die Interpretation von Ergebnissen mit Mikrosomenfraktionen und gereinigten und rekonstituierten Enzymen im Hinblick auf die in vivo-Biotransformation wird somit erschwert, was die Aussagefähigkeit dieser Modellsysteme im hier diskutierten Zusammenhang mindert.

3.1.2.2 Gewebeschnitte

Gelegentlich werden für in vitro-Untersuchungen Gewebeschnitte verwendet. Auch hier werden durch die Präparationstechnik mechanische Schäden verursacht. Im Fall von Leberschnitten tritt im allgemeinen im Innern des Gewebes eine Nekrose auf, da dort der hohe Sauerstoffbedarf nicht mehr gedeckt wird. Da dieses Modellsystem einige der oben genannten Nachteile umgeht, stellt es eine bessere Annäherung an in vivo-Verhältnisse dar, ist jedoch, was Qualität und Reproduzierbarkeit betrifft, vom präparativen Geschick des Experimentators abhängig.

3.1.2.3 Perfundierte Leber

Die perfundierte Leber [189] und andere perfundierte Organe sind Modellsysteme hoher in vitro-in vivo-Korrelation. Sie wurden in einer größeren Anzahl von Arbeiten zur Biotransformation eingesetzt [z.B. 190-196]. Das gesamte Organ mit Zellen, Kapillarverteilungssystem und wesentlichen Stoffwechselfunktionen bleibt intakt, allerdings nehmen verschiedene, für die Biotransformation wichtige Enzymaktivitäten während es Experiments in unterschiedlicher Weise ab [197]. Weitere Nachteile dieses Systems liegen darin, daß mit einer Leberpräparation nur ein Medikament untersucht und die Vitalität der Präparation während des Experiments nur schwer überprüft werden kann.

3.1.2.4 Isolierte Hepatozyten

Durch die grundlegende Arbeit von Berry und Friend [198] und die Weiterentwicklungen dieser Methode in mehreren Arbeitskreisen wurde es möglich, durch Kollagenaseperfusion isolierte Parenchymzellen der Leber (Hepatozyten) zu präparieren, die ihre Vitalität durch verschiedene Testmethoden unter Beweis stellen: metabolische Charakteristika dieser Zellen (Glukoneogeneseraten, Proteinsynthese, Hormonsensivität) ähneln den in vivo auftretenden Verhältnissen [199-201]. Morphologisch sind die Zellen nach licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen intakt. Die Zellen schließen Trypanblau aus und verlieren im Verlauf einer vierstündigen Inkubation nur 5 - 10% der zelleigenen Laktatdehydrogenase, beides ein Indiz für eine intakte Plasmamembran.Diese Charakterisierung stellt die Integrität der Zellen unter Beweis.

Die bisher erschienene Literatur zeigt, daß isolierte Hepatozyten, insbesondere der Ratte, zu Biotransformationsuntersuchungen einer Reihe von Xenobiotika herangezogen wurden (Übersichten bei [202-207]: Alphaxalon [208], Aminopyrin [209], Antipyrin und Dansylamin [210], Amphetamin [211, 212], Benzpyren [213, 214], Biphenyl [215], Butamoxan [212], Chloramphenicol [216], Cyclophosphamid [217], Ethanol und Acetaldehyd [218], Ethanol und Harmol [219], Ethylmorphin [220], Harmol [220], Isoniazid [222], Nicotin [223], Paracetamol [224-226], Phenacetin [227], Phenytoin [228], Sulfanilamid [229]. Mit in vitro-in vivo-Korrelationen befassen sich jedoch nur wenige Autoren [203, 206, 209, 212].

Hepatozytensuspensionen bieten als in vitro-Modellsysteme eine Reihe von Vorteilen:

- Die Präparationstechnik ist wenig zeit- und kostenintensiv.

- Die Qualität der Präparation ist leicht überprüfbar.

- Dosis und Expositionszeit der Verbindungen sind exakt kontrollierbar (im Gegensatz zu in vivo-Untersuchungen).

- Der Intermediärstoffwechsel ist abgekoppelt. Dadurch können Beziehungen zwischen Biotransformation und Hormonen oder anderen endogenen Substanzen untersucht werden.

- Substanzen, die sich in den Zellen anreichern, können durch Untersuchungen von Inkubationsmedium und separat aufgearbeiteten Zellen nachgewiesen werden.

- Die Zellen enthalten die zur Biotransformation notwendigen Cofaktoren, die daher nicht extern zugefügt werden müssen. Dadurch können durch Parallelinkubationen an Zellen der gleichen Leber Substanzen untersucht werden, die verschiedenartig biotransformiert werden.

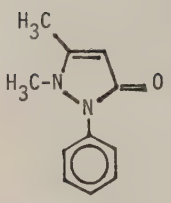
- Die Vollständigkeit des Biotransformationsmusters kann leicht überprüft werden, da das Modellsystem abgeschlossen ist und somit die Summe der gebildeten Metaboliten gleich der Menge der eingesetzten Ausgangsverbindung sein muß.

3.1.2.5 Hepatozytenprimärkulturen

Isolierte Hepatozyten bringen im Idealfall alle für die Biotransformation nötigen Faktoren mit in die Präparation ein, doch verlieren sie relativ schnell ihre Kompetenz, Fremdstoffe zu metabolisieren: die - an der überwiegenden Anzahl biotransformatorischer Prozesse beteiligten - Polysubstratmonooxygenasen in Rattenhepatozyten nehmen mit ca. 6-8% pro Stunde linear ab, so daß eine 10 Stunden alte Primärkultur nur noch 20-40% der Biotransformationskapazität aufweist. Gleichzeitig nimmt die Aktivität verschiedener Glucuronyltransferasen unterschiedlich ab (41). Dies verdeutlicht, daß Hepatozyten in Primärkultur besonders unter dem Gesichtspunkt der quantitativen in vitro -in vivo-Korrelation für Biotransformationsuntersuchungen ungeeignet sind, sofern nicht Substanzen gefunden werden, die die Kultur zur fakultativen Bereitstellung der metabolisierenden Enzyme anregen.

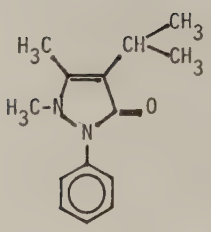
3.1.3 Biotransformation von Aminopyrin

Als eine besonders gut untersuchte Fremdsubstanz aus der Gruppe der analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch wirksamen Δ^3-Pyrazol-(5)-one (siehe Abbildung 2) wurde Aminopyrin ausgewählt, welches 1856 von Stolz synthesisiert wurde und sich wenig später als "Pyramidon" einen Namen machte.

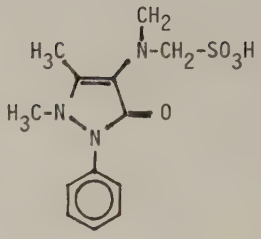


Phenazon

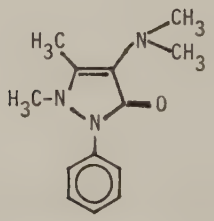
(Antipyrin®)



Propyphenazon

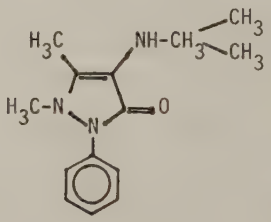


Noramidopyrinmethan-
sulfonat
(Metamizol, Novalgin®)



Aminopyrin

(Pyramidon®)



Isopyrin

(Tanderil®)

Abbildung 2: Analgetika der Δ^3-Pyrazol-(5)-one

Aminopyrin ist heute in der Bundesrepublik als Pharmakon wegen der mit Nitrit möglichen Bildung von cancerogenem Dimethylnitrosamin nicht mehr im Handel. Unberührt davon bleibt jedoch der Modellcharakter dieser Substanz für biochemische und pharmakologische Untersuchungen, der sich in einer beinahe unüberschaubaren Anzahl von Publikationen äußert.

Die Biotransformation von Aminopyrin ist Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen [230-306], deren Ergebnisse schematisch in Abbildung 3 zusammengefaßt sind.

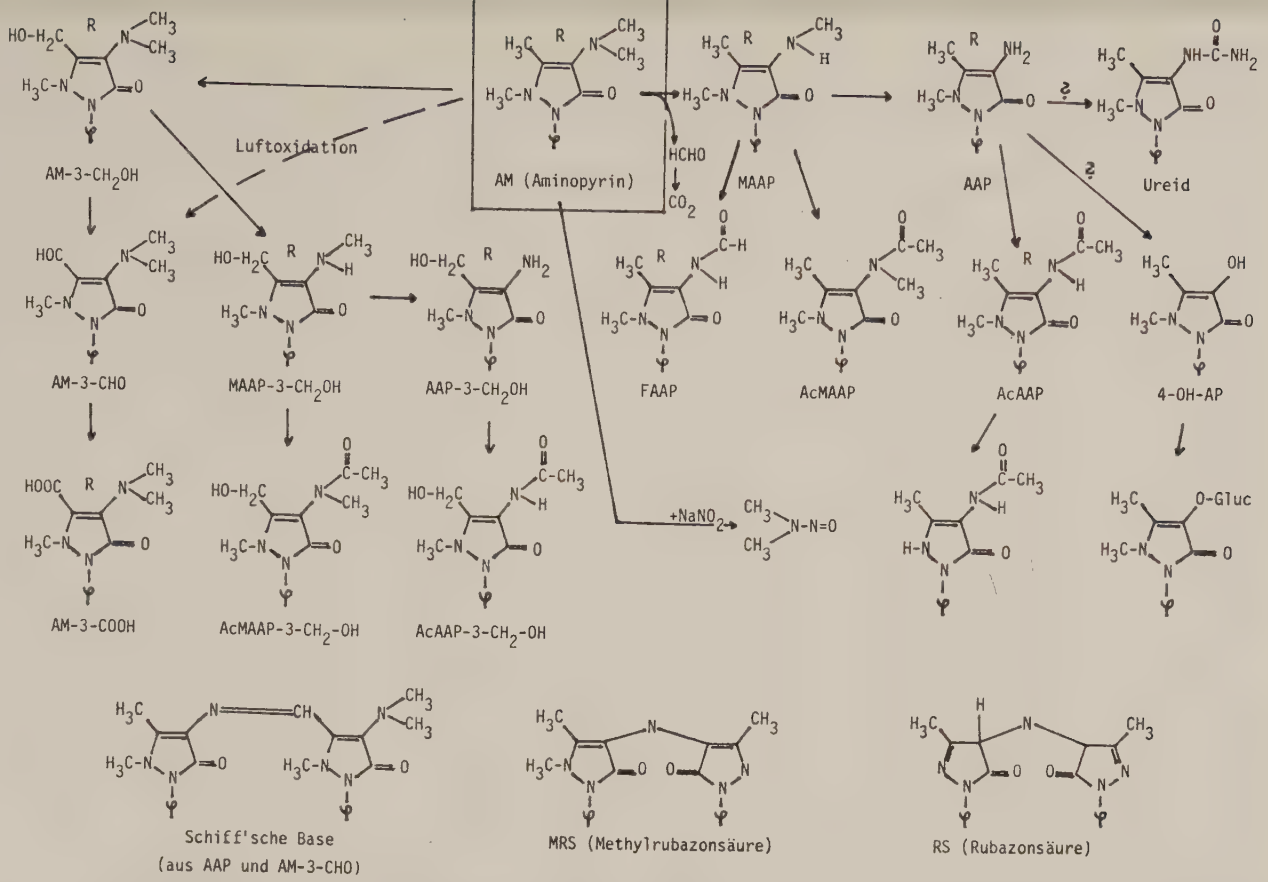


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Biotransformation von Aminopyrin und im Text verwendete Abkürzungen. Gluc = Glucuronyl, φ = Phenyl; Metaboliten die in Rattenurin nach Aminopyringabe durch "Deuterium-Labeling" mit GC-MS nachgewiesen wurden (294), sind mit "R" überschrieben.

Theoretisch besitzt Aminopyrin eine Reihe von funktionellen Gruppen, die Funktionalisierungsreaktionen zugänglich sind; so könnte die 4-ständige Dimethylaminofunktion sowohl durch Dealkylierung wie auch durch N-Oxidation biotransformiert werden. Letzteres wird - aus bisher ungeklärten Gründen - nicht beobachtet. Die N-Dealkylierung führt in vivo überwiegend zum Aminoantipyrin (AAP). Damit nimmt Aminopyrin in dieser Beziehung eine Zwischenstellung zwischen aromatischen und aliphatischen Aminen ein; bei letzteren wäre mehr monodemethylierter Metabolit zu erwarten [307, 308]. Quantitativ weniger bedeutende Wege als die N-Dealkylierung führen zu Metaboliten, die meist durch Oxidation der 3-ständigen Methylgruppe entstehen.

Die nun 80jährige Bearbeitung der Biotransformation von Aminopyrin zeigt, welche Fortschritte auf diesem Gebiet durch Methoden der instrumentellen Analytik - insbesondere der Chromatographie - möglich wurden: Etwa die Hälfte der in Abbildung 3 gezeigten Metabolitenstrukturen sind während der letzten 10 Jahre bekannt geworden. Vergleichbare Fortschritte wurden auch beim Verständnis des biochemischen Hintergrundes der Biotransformation gemacht.

Die N-Demethylierung verläuft hauptsächlich Polysubstratmonooxygenase-katalysiert. Wird die Polysubstratmonooxygenase-Aktivität für verschiedene Substrate bei Leberperfusionsversuchen bestimmt, nimmt sie substratabhängig ab: nach vierstündiger Perfusion mit den Fremdsubstanzen in Einzelexperimenten betragen Anilinhydroxylase- und p-Nitroanisol-o- demethylaseaktivität ca. 90% des Ausgangswertes, während die Aminopyrin-N-demethylaseaktivität auf 40% abfällt [309]. Die Bestimmung des Polysubstratmonooxygenase-Gehaltes dieser Präparation zeigt jedoch keine signifikanten Unterschiede, was durch zwei Hypothesen erklärt werden kann:

1. Die N-Demethylierung von Aminopyrin verbraucht mehr Energie (NADPH und/oder NADH), als verfügbar ist.

2. Metaboliten von Aminopyrin hemmen die Polysubstratmonooxygenase kompetitiv.

Zu 1.:
Wird bei den oben dargestellten Perfusionsversuchen Nicotinsäure (eine Vorstufe der Biosynthese von NAD und NADP) zugegeben, so ist der Polysubstratmonooxygenase-Aktivitätsverlust weniger drastisch, doch größer als bei den anderen Enzymen [309]. Scholz und Mitarbeiter untersuchten die Wechselwirkung PSMO-katalysierter Reaktionen mit biosynthetischen Prozessen wie Glukoneogenese [208] und Lipogenese [206] am Beispiel von Aminopyrin. Sie kamen zu folgenden Hypothesen:

"In der Gegenwart aktiver NADPH-verbrauchender Prozesse (wie die 'mixed-function'-Oxidation von Aminopyrin) tritt ein sinnloser Cyclus in der Glukoneogenese auf, an dem die Malatdehydrogenase beteiligt ist und der durch eine größere Rate des Pyruvatcarboxylase-Reaktion kompensiert wird." *) (Siehe auch Abbildung 4.) [268]. "..... 'mixed function'-Oxidation und Fettsäuresynthese konkurrieren um extramitochondriales NADPH. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die NADPH-Versorgung - unter extremen Bedingungen erhöhter 'mixed-function'-Oxidation - der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die hepatische Lipogenese sein kann." [267] *)

Die obigen Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Biotransformation von Aminopyrin durch das Angebot von NADPH und NADH limitiert werden kann. Dies würde jedoch bedeuten, daß andere PMSO-katalysierte Biotransformationsreaktionen (Anilinhydroxylierung und p-Nitroanisol-O-demethylierung) einen wesentlich geringeren Energiebedarf haben und vermutlich nicht den sinnlosen Cyclus der Glukoneogenese in Gang setzen.

*) Übersetzung von mir

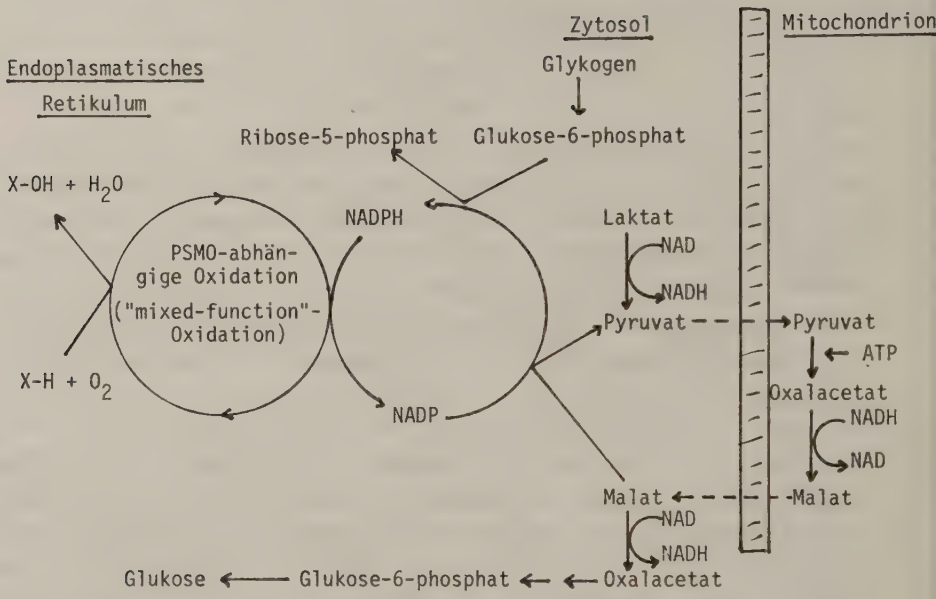


Abbildung 4: Interaktion der Biotransformation von Aminopyrin mit der Gluconeogenese aus Zwischenprodukten des Tricarbonsäurezyklus. Leicht modifiziert nach Scholz (268).

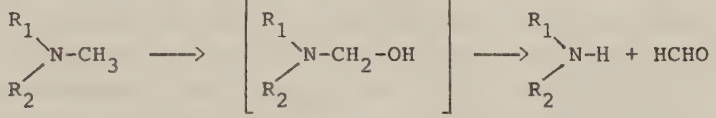
Zu 2.:

Lauterburg und Bircher [279] untersuchten verschiedene Aspekte der die Biotransformation von Aminopyrin beeinflussenden Faktoren. Ihre Ergebnisse bei Ratten mit Gallengang-Ligatur (gleiche V_{max}, aber größeres K_d als bei Kontrolltieren) lassen auf kompetitive Inhibition der Aminopyrindemethylierung schließen. Dies wird erhärtet durch den inhibitorischen Effekt der im Urin von Ratte und Kaninchen und in Rattengalle gefundenen Schiff'schen Base (siehe Abbildung 3) auf die Biotransformation von Aminopyrin, Acetanilid und Amobarbital [281].

Trotz zum Teil kontroverser Ergebnisse kann die Polysubstrat-monooxygenase-abhängige N-Dealkylierung von Aminopyrin charakterisiert werden als

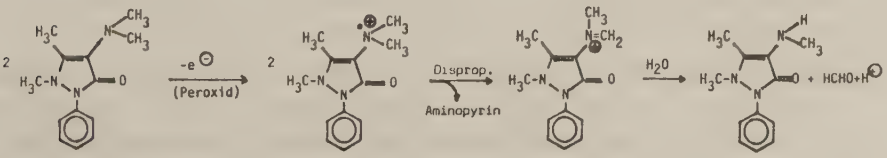
- Reaktion mit großem Energiebedarf in Konkurrenz mit Biosyntheseprozessen,
- PB-induzierbar, nicht 3-MC-induzierbar,
- teilweise inhibiert durch Biotransformationsprodukte,
- teilweise inhibiert durch SKF 525A und Methyrapon und
- teilweise extrahepatisch verlaufend [279].

Die heute wohl allgemein als tragfähig angesehene Hypothese zum Mechanismus der N-Demethylierung [10] postuliert die intermediäre Bildung eines Carbinolamins, das unter Bildung von Formaldehyd und demethyliertem Amin zerfällt:



Allerdings wurden solche Carbinolamine bislang noch nicht nachgewiesen. Neuere Untersuchungen zeigen darüber hinaus eine überraschende Parallelität zwischen elektrochemischer und biologischer N-Dealkylierung [310, 311], so daß ein radikalkationischer Mechanismus erneut in Betracht gezogen werden sollte:

Die Cooxidation von Aminopyrin durch PGG_2 (ein aus Arachidonsäure gebildetes Hydroperoxyendoperoxid der Prostaglandin-Biosynthese) oder durch Lipidperoxide führt durch einen solchen Elektronenübertragungsmechanismus ebenfalls zur N-Dealkylierung, wie Lasker und Mitarbeiter mittels Elektronenspinresonanz zeigen konnten [292]:



Zumindest in einigen Fällen scheint dieser Mechanismus auf PS-MO-gekoppelte N-Demethylierung anwendbar.

3.2 Analytische Aspekte

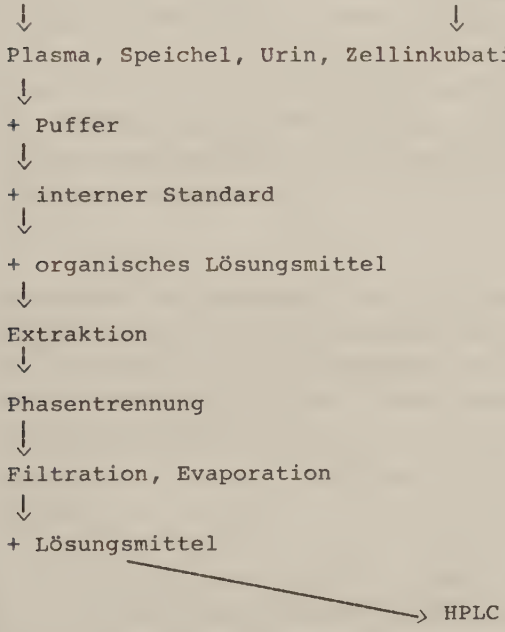
Wie erwähnt, begünstigte die Entwicklung chromatographischer Methoden Biotransformationsuntersuchungen durch selektiven und empfindlichen, qualitativen und quantitativen Nachweis gebildeter Metaboliten. Unter diesen Methoden sind vor allem Gaschromatographie (GC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Kopplung an leistungsfähige Detektoren wie z.B. das Massenspektrometer (MS) zu nennen. Bei dieser Art von Kombination führen Isotopenmarkierungstechniken wie ^{14}C- und ^{2}D-Labelling zur eindeutigen Identifizierung der Biotransformationsprodukte. Dies wurde am Aminopyrin-Metabolismus von Gorumaru und Mitarbeitern [294] überzeugend dargestellt.

Gaschromatographische Untersuchungsmethoden sind besonders zur Untersuchung kleinerer, in Substanz oder als Derivat verdampfbarer Moleküle geeignet. Die dabei einsetzbaren Detektoren gestatten sowohl Detektion mit breiter (Totalionenstrom im MS, FID) wie auch höchster Selektivität ("selected ion monitoring" im MS, NP- und EC-Detektor). Bei Biotransformationsuntersuchungen besteht jedoch oft der Nachteil, daß für zunächst unbekannte Metabolite geeignete Derivatisierungs- und Trennbedingungen schwer auffindbar sind. So wird hier diese Technik (deren Entwicklung hauptsächlich auf Problemstellungen der erdöl verarbeitenden Industrie zurückgeht [312]) durch die HPLC ersetzt, deren Ursprung mehr auf Fragestellungen von pharmazeutischer und klinischer Forschung beruht [312-315].

Metaboliten liegen zunächst in biologischen Matrices (Serum, Galle, Urin, Perfusions- und Inkubationsmedien etc.) vor, die besondere Anforderungen an die analytischen Methoden stellen.

So muß das in großem Überschuß vorliegende, meist mit dem Trennsystem interferierende Begleitmaterial (Salze, Proteine etc.) vor der eigentlichen Analyse entfernt werden. Zusätzlich dazu muß die Probenaufarbeitung auch Konzentrierungsschritte enthalten, um quantifizierbare Konzentrationen der Probe sicherzustellen.

Diese Schritte werden normalerweise durch Extraktions- und Konzentrierungsmethoden erreicht, wie sie im folgenden Schema für den Fall der HPLC wiedergegeben sind:



Diese Probenvorbereitungsschritte sind zeitintensiv und stellen potentielle Fehlerquellen dar [316]; je nach zu untersuchenden Verbindungen und Art der Matrix muß die Probenaufarbeitung daher optimiert werden [317].

Die Entwicklung exakter und einfacherer Probenaufarbeitungstechniken wird bei der Darstellung der Ergebnisse diskutiert.

4. ERGEBNISSE

4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Analyse der Xenobiotika und ihrer Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten [317-319]

Komponenten biologischer Matrices, aus denen Xenobiotika und ihre Metaboliten analysiert werden, interferieren oft im Trennsystem mit den interessierenden Verbindungen. Gleichzeitig besteht bei direkter Injektion die Gefahr von Überlastung und Kontamination der analytischen Säule.

Drei Lösungswege bieten sich für derartige Probleme an:

1. Entwicklung selektiver Trennbedingungen
2. Verwendung selektiver Detektionsmöglichkeiten und
3. Entfernung der Matrix durch Probenaufarbeitung.

Zu 1.:
Durch Variation von Eluent und stationärer Phase können für einfache Probleme Lösungswege gefunden werden. Eine besonders elegante Methode beschreiben Reingold und Mitarbeiter [320], die Folsäurederivate auf der Säule durch in situ Erzeugung von Ionenpaaren retardierten, bis die interferierenden Komponenten der Matrix eluiert sind.

Zu 2.:
Die einfachste Möglichkeit der UV-Detektion ist die Wahl von Wellenlängen, bei denen Matrixkomponenten wenig absorbieren. Diese Methode wird jedoch durch die breite UV-Absorption dieser Komponenten erschwert. Fluoreszentdetektion ist die Methode der Wahl, wenn die zu analysierenden Verbindungen fluoreszieren. Dies geht oft - wie z.B. bei der Analytik von Tocopherolen gezeigt werden konnte [321, 322] - mit einer beträchtlichen Steigerung der Nachweisempfindlichkeit einher. Eine große

Anzahl von Verbindungen, wie z.B. Catecholamine [323] und wasserlösliche Vitamine [324], können durch elektrochemische Detektion selektiv nachgewiesen werden.

Zu 3.:
Die meiste Aufmerksamkeit muß jedoch der Entwicklung einer effizienten Probenaufarbeitung gewidmet werden, da hier wesentliche Fehlerquellen liegen.

4.1.1 Trennsysteme für Aminopyrin und Metaboliten

Zur effektiven Untersuchung des Aminopyrin-Metabolismus mit HPLC mußte zunächst ein Trennsystem gefunden werden, welches Aminopyrin und seine Metaboliten in zufriedenstellender Weise trennt. Ein solches System wurde in der Literatur nicht gefunden.

"Reversed Phase" (RP)-Ionenpaarchromatographie (RP-PIC) mit Heptan-, Octan- und Camphersulfonsäure, mit organischen Zusätzen von Acetonitril, Methanol und 1-Pentanol wurden bei mehreren pH-Werten untersucht. Unter diesen Systemen trennt folgendes FAAP, AAP, MAAP und Aminopyrin in etwas weniger als 40 Minuten auf einer 4.6 x 125 mm LiChrosorb RP-8 (5 µm)-Säule bei 50°C:

1.0 mmol Octansulfonsäure
1.0 mmol Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH)
10.0 mmol Natriumdihydrogenphosphat

eingestellt auf pH 7.8 (KOH) mit 10% (v+v) Acetonitril. Formyl- und Acetylmetabolit werden nicht getrennt.

Die Untersuchung von RP-Systemen mit gepufferten Salzlösungen führt zu einem Trennsystem, in dem die Hauptmetaboliten und Aminopyrin in etwa 30 min getrennt werden (Abbildung 5):

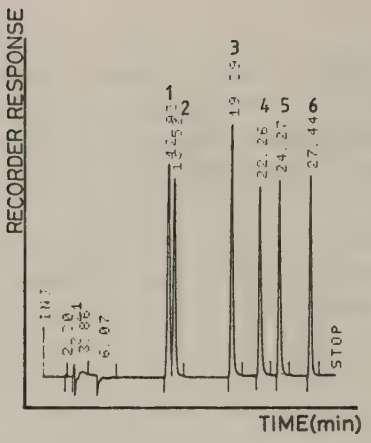


Abbildung 5: HPLC-Trennung der Hauptmetaboliten von Aminopyrin (Standardlösung). Säule: 4 x 250 mm LiChrosorb RP-18 (5 µm) (Merck); Eluent A: 20 mmol Natriumdihydrogenphosphat (pH 8.0, NaOH), Eluent B: Acetonitril; Gradient: 0 bis 8 min isokratisch 13% B, 8 bis 30 min 13% bis 43% linear (= 0.73%/min); Fluß: 1 ml/min; Temperatur: 40°C; Injektionsvolumen: 50 µl, Chromatograph: Hewlett Packard 1010B; Detektion bei 257 nm; Detektor: LDC Spektro Monitor II; Peaks: 1 = 4-Formylaminoantipyrin 28.38 mg/l; 2 = Acetylaminoantipyrin 25.38 mg/l; 3 = Aminoantipyrin 24.64 mg/l; 4 = Methylaminoantipyrin 23.76 mg/l; 5 = Aminopyrin 24.42 mg/l; 6 = Isopropylaminoantipyrin (interner Standard).

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, daß andere Chargen der gelieferten Säulen veränderte Selektivität zeigten und so die Trennung von Formyl- und Acetylmetabolit nicht mehr möglich war. Unter dieser Einschränkung ist die Analyse auch auf einer mit 3 µm-Material gepackten Säule in weniger als 6 min durchführbar (Abbildung 6).

Wegen der etwas besseren Standzeiten und der geringeren Gefahr der Verstopfung durch biologisches Material bei 5 µm Säulen wurde das in Abbildung 5 gezeigte Trennsystem für die Analytik der Aminopyrin-Biotransformation gewählt.

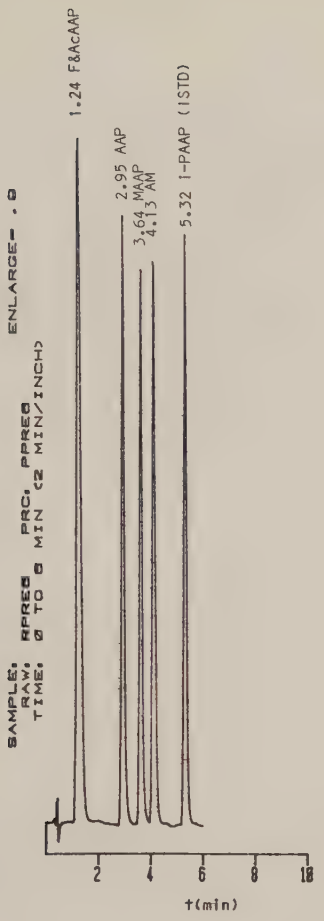
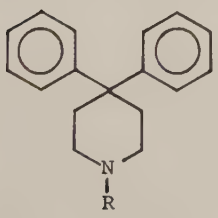


Abbildung 6: Trennung der Hauptmetaboliten von Aminopyrin
Säule: 4 x 60 mm, Hypersil ODS (3 µm) (Bischoff); Eluent A: 10 mmol Natriumdihydrogenphosphat; Eluent B: Acetonitril; Gradient: 1 min isokratisch bei 10% B, 1 bis 5 min von 10 bis 30% B (= 7.5%/min); Fluß: 2 ml/min; Raumtemperatur; Injektionsvolumen: 20 µl; Gradientenformer: M 2500, Konstantflußpumpe M 600/200 (Gynkotek); Detektion: 257 nm; var. UV-Detektor Hewlett Packard 1030B.

4.1.2 Trennsysteme für N-alkylsubstituierte Diphenylpiperidine und Metaboliten



N-alkylsubstituierte 4,4-Diphenylpiperidine der nebenstehenden Formel mit R = H und Alkylresten von Methyl bis Hexyl lassen sich durch Kapillargaschromatographie underivatisiert trennen (Abbildung 7).

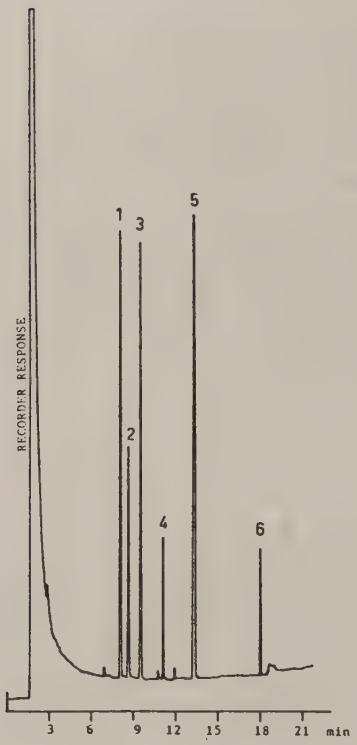


Abbildung 7: Kapillargaschromatographische Trennung verschiedener N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine. Lösungsmittel: Essigester; 0.20 mm x 25 m OV 1 (fused silica, Hewlett Packard); Trägergas: Helium (1,2 kg/cm²); Split ca. 1: 100; Injektor- und Detektortemperatur: 270°C; Temperaturprogramm: von 185°C mit 5°C/min linear ansteigend; Detektor FID: 0.7 kg/cm² H_2, 0.8 kg/cm² synth. Luft; Peaks: 1: R = H; 2: R = CH_3; 3: R = C_2H_5; 4: R = n-C_3H_7; 5: R = n-C_4H_9; 6: R = n-C_6H_{13}. Carlo Erba, Fractovap 2501.

Die verwendete Kapillare besitzt basische Eigenschaften, was sich in starker Adsorption von Säuren (2-Ethyl-hexansäure: 33% Wiederauffingungsrate) und schwacher Basenabsorption (Dicyclohexylamin: 92% Wiedrauffindungsrate) beim Grob-Test [350, 351] zeigt (Abbildung 8).

Mit dieser Methode sind die zu untersuchenden Substanzen und ihr N-Dealkylierungsprodukt meßbar. Verschiedene Probenaufarbeitungstechniken (Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln, Aufarbeitung über sep-pak-Kartuschen) für wäßrige Lösungen zeigten jedoch für 4,4-Diphenylpiperidin im Konzentrationsbereich unter 1 mg/l Schwankungen der Wiederauffingungsrate von bis zu 50%.

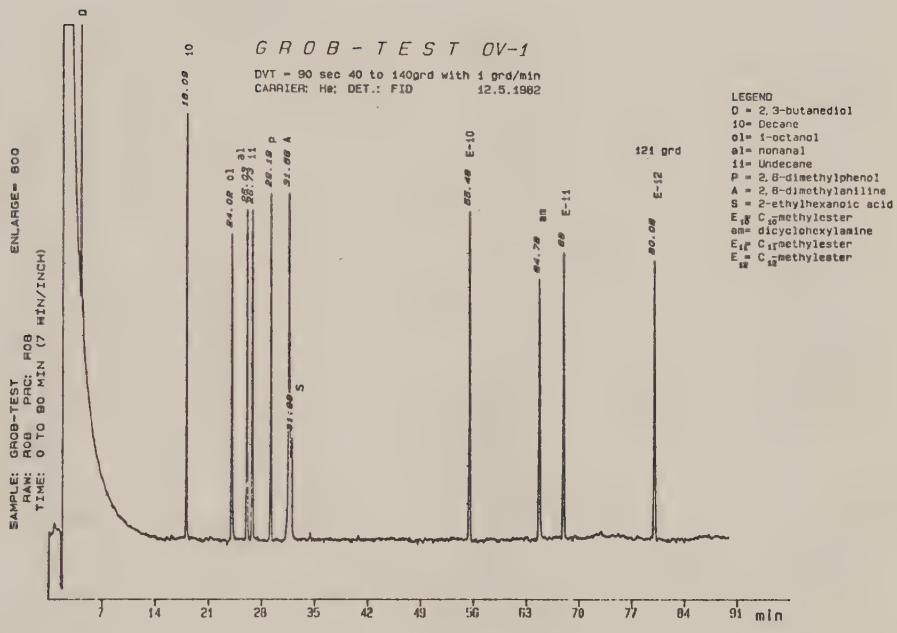


Abbildung 8: Quantitatives Adsorptionsverhalten der verwendeten Quarzkapillare.

Da der darüberliegende Konzentrationsbereich auch durch HPLC zugänglich sein sollte, wurde mit dieser Methode ein Trennsystem für 4,4-Diphenylpiperidine entwickelt.

Untersucht wurden verschiedene stationäre RP-Phasen (SAS, C-8, C-18) und Eluenten (5 mmol $KClO_4$, 20 mmol $KClO_4$, 20 mmol $NaClO_4$, 10 mmol $NaClO_4$, 20 mmol NaH_2PO_4, 10 mmol Na-Borat pH 9, 10 mmol Heptansulfonat pH 5 und 7.5, H_2O, H_2O pH 2.7 (H_2SO_4)) mit Acetonitril als Moderator. Bei Eluenten ohne pH-Angabe wurden pH-Werte von 2 bis 9 untersucht. Die besten Trennbedingungen lieferte das in Abbildung 9 dargestellte Trennsystem auf sphärischem Material (Nucleosil 5-C-18).

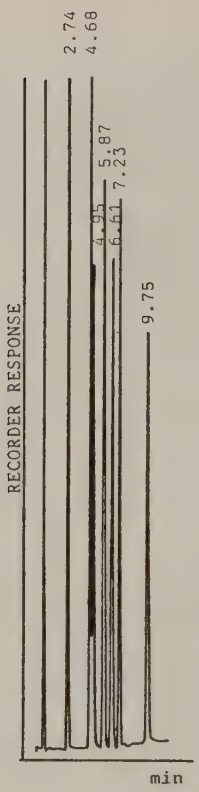


Abbildung 9: HPL-Chromatogramm einer Standardmischung verschiedener N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine (R = H, $(CH_3)_2$ (quarternär), Propyl, t-Pentyl, Neopentyl, n-Hexyl, Benzyl). Konzentrationen ca. 2.5 g/l pro Komponente. Säule: 4 x 125 mm Nucleosil 5-C-18 (Bischoff); Eluent A: 20 mmol Natriumperchlorat pH 2.5 ($HClO_4$)/Acetonitril (7030/v+v); Eluent B: Acetonitril; Gradient von 0% B mit 1.33% B/min linear ansteigend; Fluß: 2 ml/min; Raumtemperatur; Injektionsvolumen: 20 µl; Gradientenformer M 2500 und Konstantflußpumpe M 600/200 (Gynkotek); Detektion: UV bei 220 nm (LC-75, Perkin Elmer).

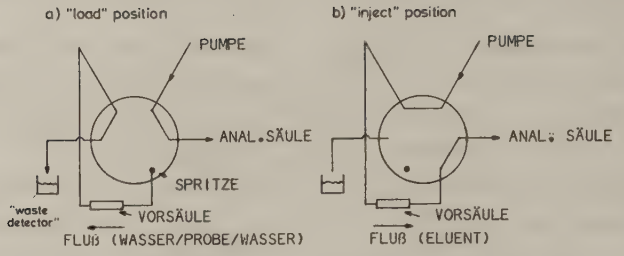
Da es sich in Abbildung 9 um eine Standardmischung zur Entwicklung des Trennsystems handelte, wurde auf Peakzuordnung verzichtet. Das so erhaltene Trennsystem kann leicht durch Variation des Acetonitrilgehaltes an die Biotransformationsuntersuchung der einzelnen Substanzen angepaßt werden.

4.2 HPLC-Vorsäulentechnik zur direkten Analytik von Xenobiotika und ihren Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten [317]

Vorsäulentechniken werden in der HPLC zur Anreicherung [325-331], Aufreinigung [332-339], Derivatisierung der Probe [340-348] oder zur effektiven Entfernung absorbierender oder fluoreszierender Verbindungen aus dem Eluenten [349] verwendet. Ausgehend von der Überlegung, daß hochpolare Matrixkomponenten auf "reversed phase" (RP)-Phasen nicht oder wenig retardiert werden, sich aber hydrophobe Verbindungen aus Injektionsvolumina bis zu einigen hundert ml [325] ohne Verlust anreichern lassen, wurde eine Vorsäulenmethode entwickelt, die mit einfachen Mitteln Probenanreicherung und -reinigung in das analytische System integriert.

Zur Entwicklung des Systems wurde als biologische Flüssigkeit standardisiertes Humanserum verwendet, das mit den zu untersuchenden Verbindungen versetzt wurde. Zunächst wird die Probe auf die mit Wasser konditionierte "reversed phase" Vorsäule aufgetragen, wo lipophile Komponenten adsorbiert werden, während hydrophile Substanzen (z.B. Proteine) mit weiterem Wasser oder Pufferlösung von der Säule gespült werden. Die interessierenden Verbindungen sind nun auf der Vorsäule adsorbiert, liegen jedoch in manchen Fällen nicht in der für die Chromatographie geeigneten Form vor (s.u.). Diese Form kann z.B. durch die folgende Injektion von Säure hergestellt werden, deren Überschuß wiederum durch Wasser entfernt wird. Zur besseren Überprüfung des Reinigungsvorganges wird der Vorsäulenauslaß in ein mit 50%igem Acetonitril gefülltes Becherglas geleitet ("waste detector"), wo das Präzipitieren der Proteine verfolgt werden kann. In Abbildung 10 sind Flußdiagramm und Reinigungsschritte schematisch zusammengestellt.

Die Wiederauffindungsraten von Aminopyrin und seinen Hauptmetaboliten wurden zunächst aus wäßrigen Standardlösungen mit der Vorsäulenmethode bestimmt. Die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse zeigen Wiederauffindungsraten von nahezu 100% für alle Verbindungen.



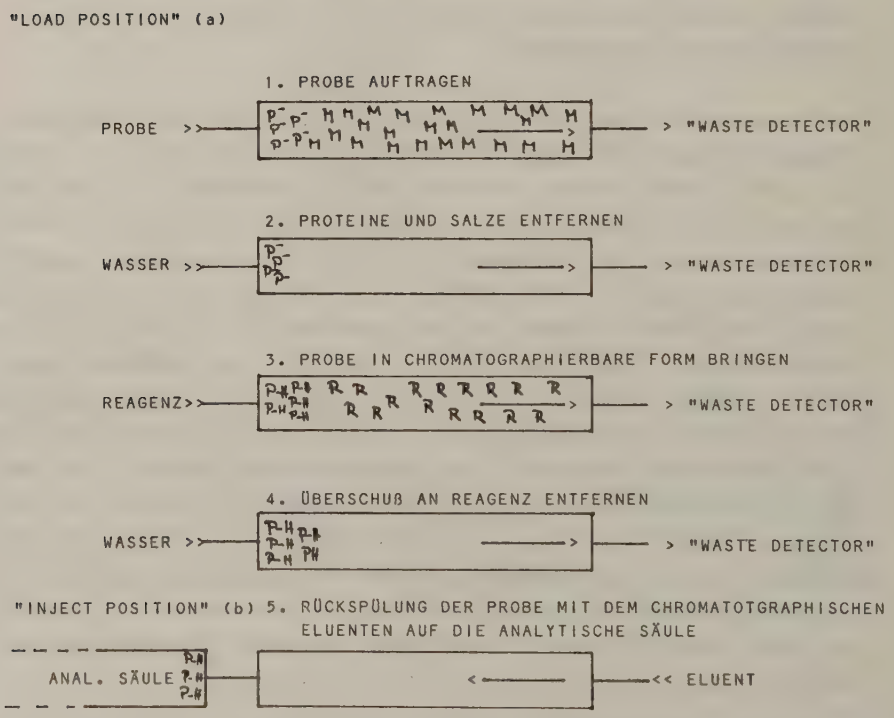


Abbildung 10: Schematische Darstellung von Flußdiagramm und Reinigungsschritten der Vorsäulentechnik.

Bei mit denselben Verbindungen versetztem Humanserum ergeben sich ebenso gute Wiederauffindungsraten, nur erniedrigen sich die Korrelationskoeffizienten geringfügig aufgrund von Interferenzen mit dem etwas höheren Untergrund. Dies zeigt, daß die Bindung an das RP-Material fester als die Serumproteinbindung ist.

Im untersuchten Konzentrationsbereich ist die Reproduzierbarkeit von Serum-Messungen mit der Vorsäulenmethoden besser als 5% (Aminopyrin, 1.45 $\pm$ 0.71%; Methylaminoantipyrin 2.55 $\pm$ 2.01%; Aminoantipyrin 2.48 $\pm$ 2.49%; Acetylaminoantipyrin 1.38 $\pm$ 1.51%; Formylaminoantipyrin 2.01 $\pm$ 1.37%; n = 12 für jede Verbindung). Die Wiederauffindungsraten mit verschiedenen Vorsäulen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Wenn die "klassische" Probenaufarbeitung via Extraktion benutzt wird, tritt ein starker Verlust der polaren Metaboliten durch unterschiedliche Verteilungskoeffizienten auf (vgl. Abbildungen 11, 12 und Tabelle 2).

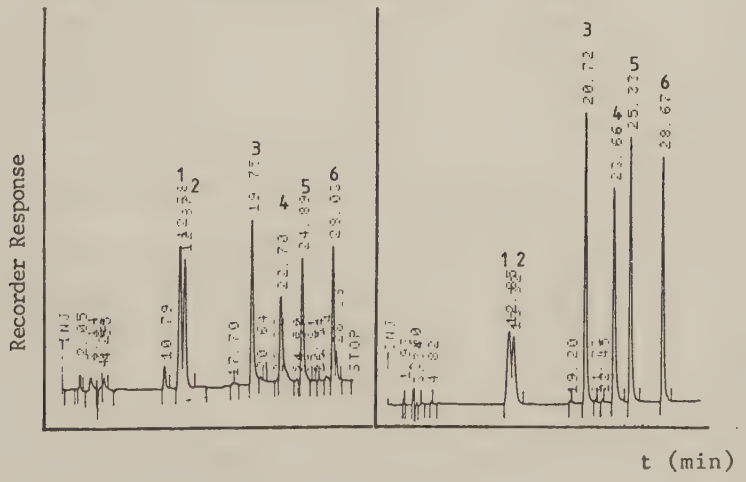


Abbildung 11: Gegenüberstellung der HPLC-Chromatogramme von Aminopyrin und Metaboliten mit Vorsäulenaufarbeitung (a) und "klassischer" Extraktion (b). Trennbedingungen wie in Abbildung 5. Peaks: 1 = Formylaminoantipyrin, 2.58 mg/l; 2 = Acetylaminoantipyrin 2.30 mg/l; 3 = Aminoantipyrin, 2.24 mg/l; 4 = Methylaminoantipyrin, 2.16 mg/l; 5 = Ainopyrin, 2.22 mg/l; 6 = Isopropylaminoantipyrin (interner Standard)

Tabelle 2: Regressionsdaten zur Wiederauffindungsrate von Aminopyrin und seinen Hauptmetaboliten (n = 4 für jede Verbindung) (Abkürzungen: AM = Aminopyrin; MAAP = 4-Methylaminoantipyrin; AAP = 4-Aminoantipyrin; AcAAP = 4-Acetylaminoantipyrin; FAAP = 4-Formylaminoantipyrin)

Substanz	Steigung	Achsenabschnitt	Korrelationskoeffizient
a) aus wäßriger Lösung mit Vorsäulenanreicherung:			
AM	0.9502	0.2193	0.9999
MAAP	0.9753	-0.0326	0.9995
AAP	0.9897	-0.0781	0.9988
AcAAP	0.9784	-0.0769	0.9999
FAAP	0.9176	0.7148	0.9997
b) aus Serum mit Vorsäulenanreicherung und -reinigung:			
AM	0.9737	0.0813	0.9999
MAAP	0.9747	-0.2151	0.9999
AAP	0.9725	0.2608	0.9947
AcAAP	0.9872	-0.1605	0.9986
FAAP	0.9501	0.4183	0.9995
c) aus Serum mit "klassischer" Extraktion:			
AM	0.9865	0.4423	0.9993
MAAP	0.9962	-0.3843	0.9999
AAP	0.9763	-0.2582	0.9999
AcAAP	0.4022	0.3384	0.9952
FAAP	0.3280	0.5587	0.9969

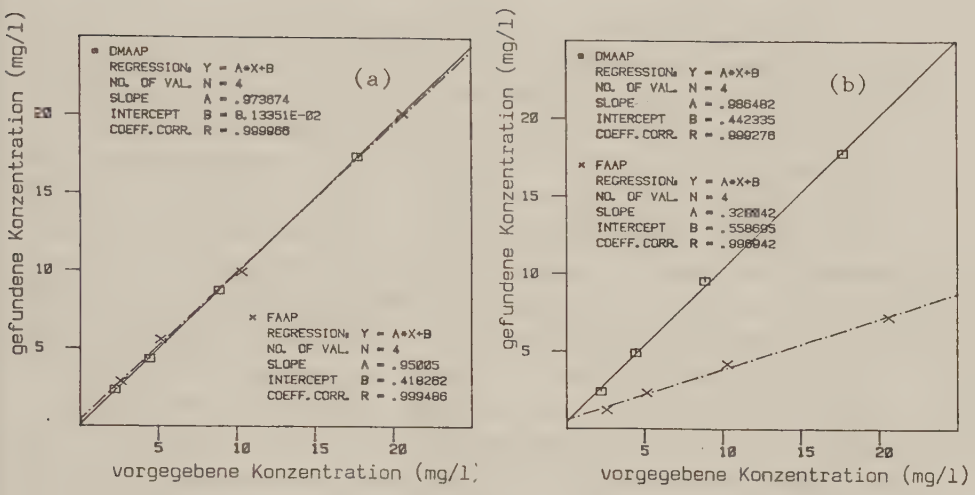


Abbildung 12: Gegenüberstellung der Wiederauffindungsraten von Aminopyrin (DMAAP) und Formylaminoantipyrin (FAAP) - den Komponenten mit größtem Polaritätsunterschied - mit Vorsäulentechnik (a) und "klassischer" Extraktion (b). Daten für die übrigen untersuchten Verbindungen siehe Tabelle 2.

4.2.1 Anwendungsbeispiele für die Vorsäulentechnik

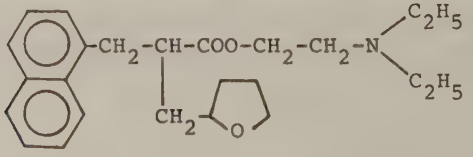
Die Entwicklung einer Technik stellt die Frage nach ihrer allgemeinen Anwendbarkeit, für die hier an verschiedenen Verbindungsklassen und unter verschiedenen Gesichtspunkten Beispiele gegeben werden sollen.

N-alkylsubstituierte 4,4-Diphenylpiperidine sollen in dieser Arbeit auf ihre Biotransformation in isolierten Hepatozyten untersucht werden. Die Anwendung der Vorsäulentechnik gelingt dann, wenn die auf der Vorsäule adsorbierten Verbindungen vor der Chromatographie in Perchlorat-Ionenpaare überführt werden.

Die Wiederauffindungsraten für 4,4-Diphenylpiperidin, N-n-Propyl-, N-t-Pentyl-, N-Neopentyl-, N-Benzyl-4,4-diphenylpiperidin und N,N-Dimethyl-4,4-diphenylpiperidiniumjodid betragen 102 ± 0.7% (n = 3 pro Verbindung). Die bei der Vorsäulentechnik immer etwas über 100% liegenden Werte entstehen durch das tatsächliche Totvolumen des "zero dead volume"-Injektionsventils, das sich aufgrund der obigen Daten zu etwa 0.4 µl errechnet. Abbildung 13 zeigt die Gegenüberstellung von Direktinjektion und Vorsäulentechnik mit den obigen Verbindungen in wäßriger Standardlösung. Mit der Vorsäulentechnik wird ein Konzentrierungsfaktor von 50 bei 102% Wiederauffindung erreicht. Abbildung 14 zeigt die Anwendung der Vorsäulentechnik auf die Analyse der Biotransformation von N-i-Propyl-4,4-diphenylpiperidin (Prodipin) in isolierten Rattenhepatozyten bei leicht modifizierten analytischen Bedingungen.

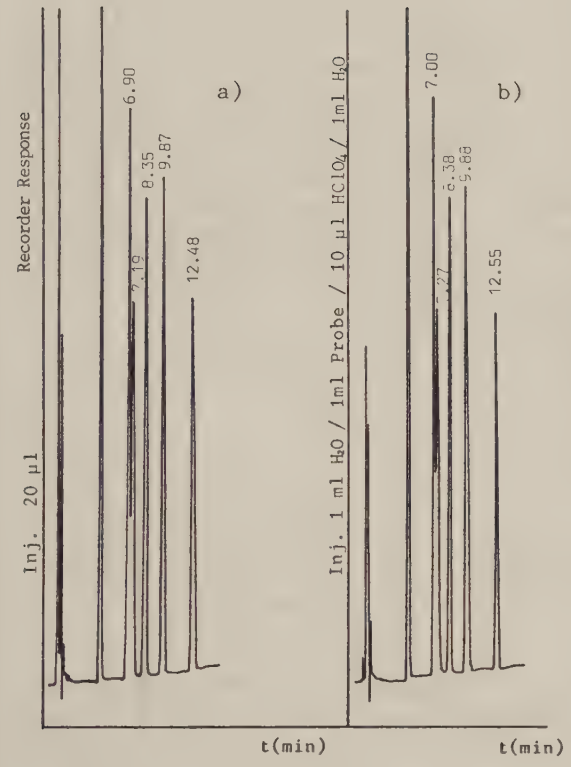
Naftidofuryl ist ein neues Pharmakon zur Therapie cerebraler und peripherer Gefäßkrankheiten [352-354]. Die 'klassische' Probenaufarbeitung von Serum zur Bestimmung von Plasmaspiegeln enthält folgende Schritte [355]: 1 ml Plasma + interner Standard, alkalisieren, Etherextraktion, zentrifugieren, Ether-Phase abpipettieren, mit Stickstoff abblasen, mit wenig Ether nachspülen, Ether abblasen, in mobiler Phase aufnehmen.

Diese normalerweise 30-40 min dauernde Probenvorbereitung kann zur routinemäßigen Bestimmung der Plasmaspiegel durch die Vorsäulentechnik ersetzt werden. Die direkte Injektion von 200 µl Plasma gestattet externe Standardisierung. Da sich die Technik auf Injektionsschritte beschränkt, kann sie in weniger als einer Minute durchgeführt werden. Die Wiederauffindungsrate beträgt 97.0 ± 1.2% (n = 5). Abbildung 15 zeigt Analysen von Naftidofuryl in Humanplasma.



Naftidofuryl

13



14

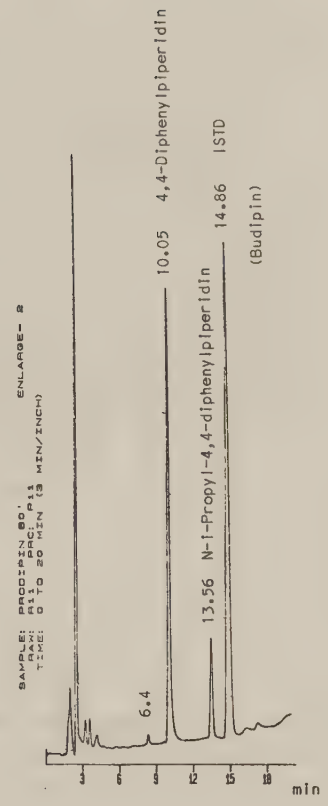


Abbildung 13: Gegenüberstellung von Direktinjektion (a) und Vorsäulentechnik (b) am Beispiel N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine. Trennbedingungen wie in Abbildung 9. Injektion: (a) 20 µl Standardmischung direkt; (b) 1 ml Wasser, 1 ml 1:50 verdünnte Standardmischung, 10 µl Perchlorsäure (70%), 1 ml Wasser auf die Vorsäule.

Abbildung 14: HPL-Chromatogramm der Trennung von N-i-Propyl-4,4-diphenylpiperidin (Prodipin) und seinem N-dealkylierten Metaboliten im Überstand einer 60minütigen Inkubation von Rattenhepatozyten (Ratte 1) mit 37.9 mg/l Prodipin. Injektion von 1 ml Wasser, 100 µl Probe, 1 ml Wasser, 10 µl Perchlorsäure (70%) und 1 ml Wasser nacheinander auf die Vorsäule. Trennbedingungen wie in Abbildung 9, jedoch mit Gradient von 0% B mit 1% B/min linear ansteigend.

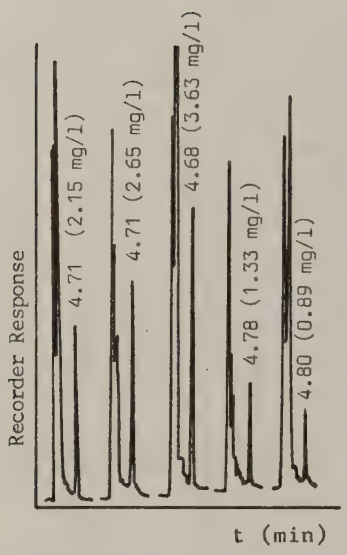
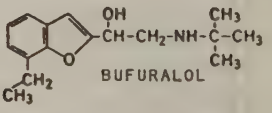


Abbildung 15: Isokratische Analyse von Naftidofuryl in Plasma mit der Vorsäulentechnik. Säule: 4 x 125 mm LiChrosorb RP-8 (5 µm), Eluent: 0.5 Gew.% Natriumdihydrogenphosphat pH 4 (Phosphorsäure)/ Acetonitril (20:80, v/v); Fluß: 1 ml/min; Temperatur: 50°C; Vorsäule: 4.6 x 40 mm LiChrosorb RP-8 (25-40 µm); Vorsäuleninjektion: 1 ml Wasser, 200 µl Plasma, 2 ml Wasser/Acetonitril (80:20, v/v); Chromatograph: Hewlett Packard 1010B; Detektion: UV bei 222 nm, LDC Spektro Monitor II.

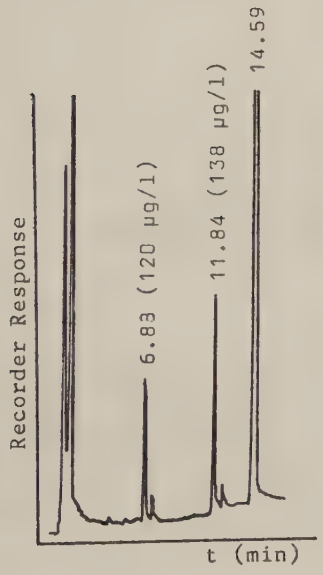


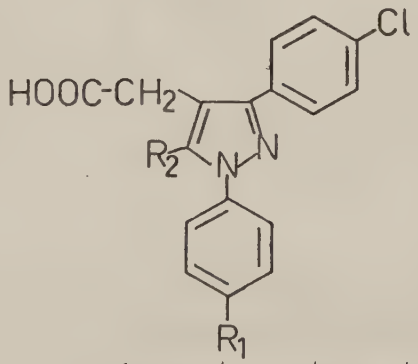
BUFURALOL

Für Fremdsubstanzen wie z.B. Bufuralol, die durch einen vererbten Defekt eines Polysubstratmonooxygenase-Isoenzyms (Debrisoquin-Polymorphismus [185]) bei einigen Patienten wesentlich langsamer als bei Kontrollpersonen metabolisiert werden, müssen schnelle Methoden zur Bestimmung der Plasmaspiegel zur Verfügung stehen. Die Vorsäulentechnik ermöglicht auch hier diese Bestimmung in weniger als 10 Minuten bei einer Wiederauffindungsrate von 101% (n = 1) (siehe Abbildung 16).

Der Metabolismus von Lonazolac wurde bereits in der Diplomarbeit ausführlich untersucht. Die Anwendung der Vorsäulentechnik gestattet die Reduzierung der Inkubationskonzentration auf 1 µmol mit einer Nachweisgrenze von 20 µg/l (Abbildung 17).

Abbildung 16: HPL-Chromatogramm von Bufuralol in Wasser (a) und Humanserum (b). Serumkonzentration: 2.4 mg/l; Säule: 4 x 125 mm Nucleosil 5-C-18 (Bischoff); Eluent A: 20 mmol Natriumperchlorat, pH 2.5 (Perchlorsäure)/ Acetonitril (70:30, v+v), Eluent B: Acetonitril; Gradient von 0% B mit 1% B/min linear ansteigend; Fluß: 2 ml/ min; Raumtemperatur; Injektion (a) 20 µl über Probenschleife (b), 2 ml Wasser, 250 µl Serum, 1 ml Wasser, 10 µl Perchlorsäure (70%), 500 µl Wasser; Chromatograph: Gradientenformer M 2500 und Konstantflußpumpe M 600/200 (Gynkotek); Injektionsventil 7125 (Rheodyne); Detektion: UV bei 275 nm (LC-75, Perkin Elmer); Peaks 5.25 und 4.38: Bufuralol.





Substanz	R_1	R_2
Lonazolac	H	H
Metabolit	OH	H
ISTD	H	Phenyl

Abbildung 17: HPLC-Tennung von Lonazolac und seinem Metaboliten M I aus dem Überstand einer 1 µmolaren Rattenhepatozyteninkubation (5 min inkubiert). Säule: 4 x 125 mm Nucleosil 5-C-18 (Bischoff); Eluent A: Wasser pH 2.7 (Phosphorsäure), Eluent B: Acetonitril; Gradient: von 30% B mit 1.5% B/min linear ansteigend; Fluß: 2 ml/min; Raumtemperatur; Vorsäule: 4x40 mm Nucleosil 30-C-18; Injektion: 1 ml Wasser pH 2.7 (Phosporsäure), 500 µl Überstand, 1 ml Wasser pH 2.7; Chromatograph: Gradientenformer M 2500 und Konstantflußpumpe M 600/200 (Gynkotek); Injektionsventil 7125 (Rheodyne); Detektion: UV bei 282 nm (LC-75, Perkin Elmer); Peaks: 6.88 = Metabolit M I, 11.84 = Lonazolac, 14.59 = interner Standard.

4.3 In vitro- und in vivo-Biotransformation von Aminopyrin bei Ratte, Maus und Meerschweinchen (356)

Die in vitro-Biotransformation von Aminopyrin wurde an isolierten Hepatozyten von Ratte, Maus, Meerschweinchen und an Humanmikrosomen untersucht. In vivo-Untersuchungen wurden an Blutplasma von Ratten, Mäusen und Meerschweinchen durchgeführt.

Der zeitliche Verlauf der Biotransformation durch isolierte Rattenhepatozyten (Abbildung 18) führt überwiegend zum einfach N-dealkylierten Metabolit Methylaminoantipyrin.

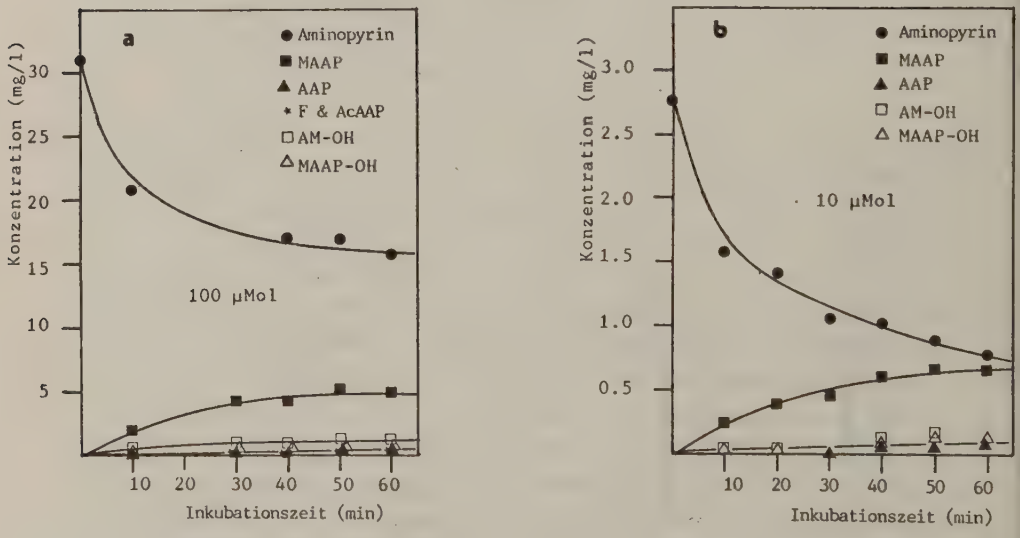


Abbildung 18: Kinetik der Biotransformation von Aminopyrin durch isolierte Hepatozyten einer männlichen, gefütterten SD-SIV-50-Ratte (a) 100 µmol, (b) 10 µmol Aminopyrin; 7.8 x 10^6 Zellen/ml; Trockengewicht: 32.8 mg/ml; Protein: 14.96 mg/ml; Vitalität (mikroskopisch) nach 30 min Inkubation: (a) 94%, (b) 91%; Inkubationsmedium: BS + Glukose-Albumin (gleiche Zellpräparation wie in Abbildung 34). Metaboliten: MAAP = 4-Methylaminoantipyrin, AAP = 4-Aminoantipyrin, F & AcAAP = 4-Formyl- und 4-Acetylaminoantipyrin, AM-OH = 2- und 3-Hydroxymethylaminopyrin, MAAP-OH = 3-Hydroxymethyl-4-Methylaminoantipyrin.

Zwei der untersuchten Hepatozytenpräparationen metabolisierten Aminopyrin wesentlich schneller als die restlichen. Abbildung 19 zeigt neben einer solchen Präparation die normierte Darstellung der Abnahme von Aminopyrin an sechs verschiedenen Inkubationen.

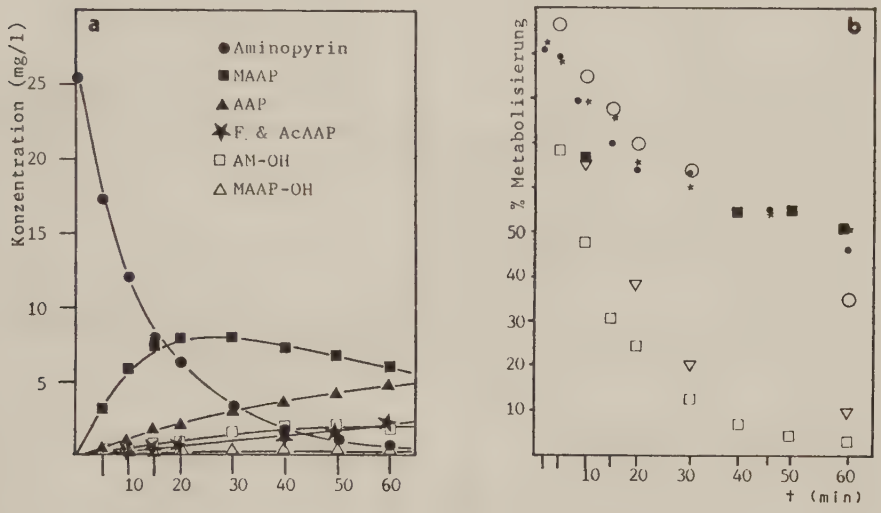


Abbildung 19: a) Kinetik der Biotransformation von 100 µmol Aminopyrin durch isolierte Hepatozyten einer männlichen, gefütterten SD-SIV-50-Ratte; 4.6 x 10^6 Zellen/ml; Trockengewicht 18.7 mg/ml; Protein 8.9 mg/ml; Vitalität (mikroskopisch) nach 30 min Inkubation: 80%.
b) Abnahme von Aminopyrin in 6 Hepatozyteninkubationen (100 µmol) an gefütterten SD-SIV-50-Ratten.

Die in vivo-Biotransformation der Ratte (Abbildung 20) führt analog zu den in vitro-Versuchen zunächst zu Methylaminoantipyrin, welches im weiteren Verlauf nochmals N-demethyliert und anschließend acetyliert wird.

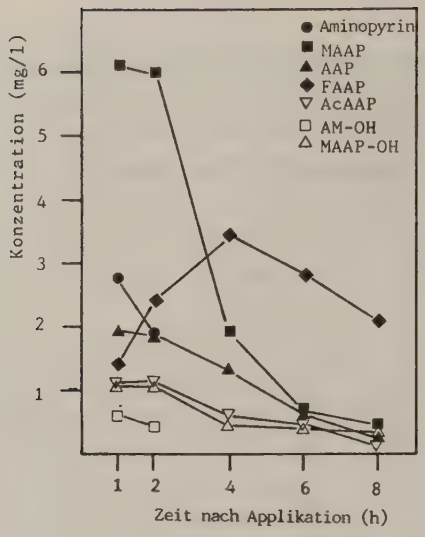


Abbildung 20: Plasmaspiegel von Aminopyrin und Metaboliten bei männlichen SD-SIV-50-Ratten nach oraler Applikation von 20 mg/kg Aminopyrin (Mittelwerte aus je 2 Tieren pro Zeitpunkt).

METABOLITEN:
MAAP: 4-METHYLAMINOANTIPYRIN
AAP : 4-AMINOANTIPYRIN
FAAP: 4-FORMYLAMINOANTIPYRIN
AcAAP: 4-ACETYLAMINOANTIPYRIN
AM-OH: 3- und 2-HYDROXYMETHYLAMINOPYRIN
MAAP-OH: 3-HYDROXYMETHYL-4-METHYLAMINOANTIPYRIN

Abbildung 21 stellt die in vitro- und in vivo-Biotransformation von Aminopyrin bei männlichen Mäusen gegenüber.

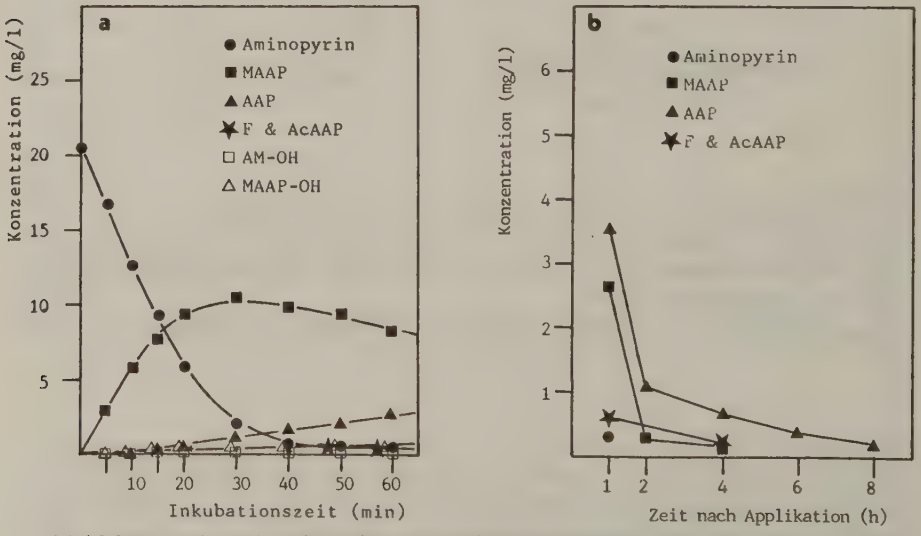


Abbildung 21: a) Kinetik der Biotransformation von Aminopyrin (100 µmol) durch isolierte Hepatozyten einer gefütterten, männlichen NMRI-Maus. 3.6 x 10^6 Zellen/ml; Trockengewicht: 9.7 mg/ml; Protein 4.6 mg/ml; Vitalität (mikroskopisch) nach 30 min Inkubation: 90%.
b) Plasmaspiegel von Aminopyrin und Metaboliten bei männlichen NMRI-Mäusen nach oraler Applikation von 20 mg/kg Aminopyrin (Mittelwerte aus je 10 Tieren pro Zeitpunkt).

Die in vitro auftretenden Metaboliten sind nach Art und Menge etwa denen der Ratte vergleichbar, jedoch zeigen die Plasmaspiegel demgegenüber deutliche Unterschiede: Seitenketten-hydroxylierte Metaboliten treten nur nach einer Stunde in Konzentrationen auf, die am Rande der Nachweisgrenze liegen, und Aminoantipyrin erreicht wegen der wesentlich geringeren Acetylierung nach einer Stunde gegenüber der Ratte etwa doppelte Konzentration.

Bei Meerschweinchen verläuft die Biotransformation in isolierten Hepatozyten (Abbildung 22) qualitativ etwas unterschiedlich gegenüber Ratte und Maus: Acetyl- und Formyl-aminoantipyrin werden weder bei 100 noch bei 10 µmolarer Inkubation gefunden; andererseits überwiegt gegen Ende der Inkubation das seitenkettenhydroxylierte Aminopyrin. In vivo liegen die Verhältnisse etwa zwischen denen von Ratte und Maus: Aminoantipyrin ist der bedeutendste Metabolit, da nur ein Teil davon acetyliert wird (Abbildung 23).

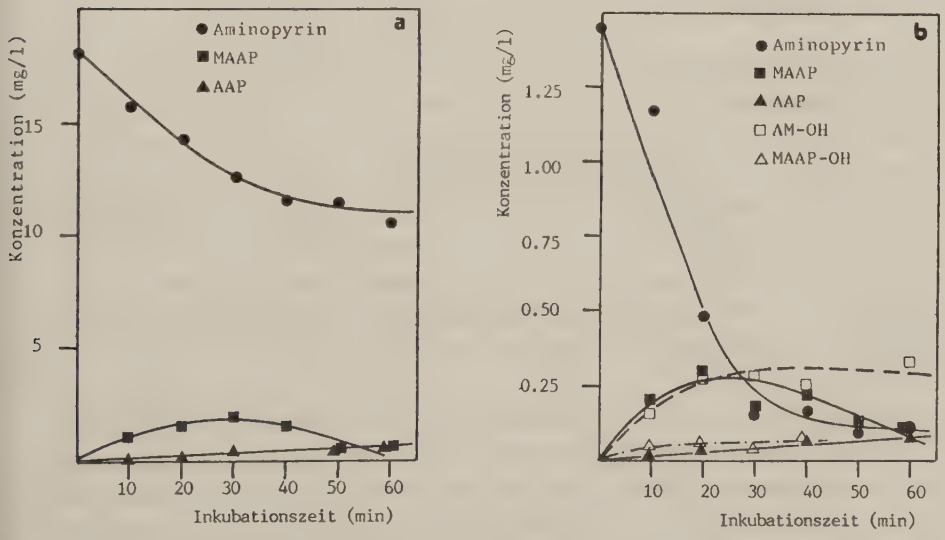


Abbildung 22: Kinetik der Biotransformation von Aminopyrin durch isolierte Hepatozyten eines männlichen Meerschweinchens (250 g). Trockengewicht: 35 mg/ml; Protein: 22.7 mg/l; Vitalität (mikroskopisch) nach 30 min; Inkubation: 80%; a) 100 µmol, b) 10 µmol Inkubationskonzentration.

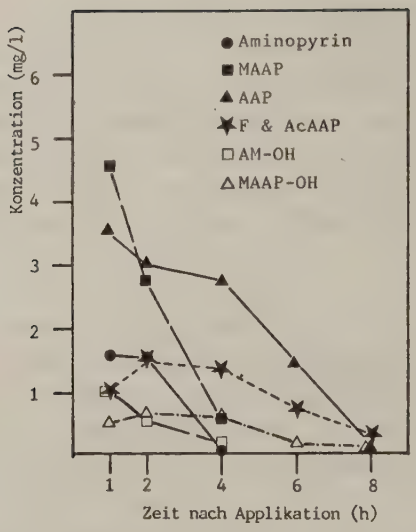


Abbildung 23: Plasmaspiegel von Aminopyrin und seinen Metaboliten in gefütterten, männlichen Meerschweinchen nach oraler Applikation von 20 mg/kg (Mittelwerte aus je 2 Tieren pro Zeitpunkt).

4.3.1 Strukturaufklärung der Aminopyrin-Metaboliten

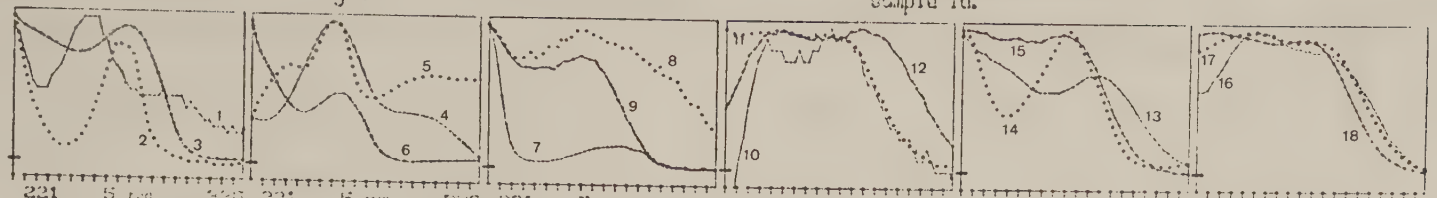
Diodenarray-Detektoren gestatten die simultane Messung des Chromatogramms bei verschiedenen Wellenlängen und ermöglichen die Registrierung und normierte Darstellung der UV-Spektren der einzelnen eluierenden Komponenten [357]. Da die Öffnung des Pyrazolonringes während der Biotransformation unwahrscheinlich ist, sollten die Absorptionscharakteristika von Aminopyrin und Metaboliten ähnlich sein. Unter dieser Voraussetzung kann die Simultandetektion mit Spektrenregistrierung als effiziente Screeningmethode für Metaboliten eingesetzt werden.

Abbildung 24 zeigt das Chromatogramm des Überstandes einer 60 minütigen Aminopyrininkubation mit Rattenhepatozyten zusammen mit den normierten UV-Spektren der einzelnen Komponenten. Abbildung 24b zeigt die entsprechende Darstellung mit Rattenserum 2 Stunden nach oraler Applikation von 20 mg/kg Aminopyrin. Weitere Spektren und Chromatogramme hierzu finden sich im Anhang (7.2).

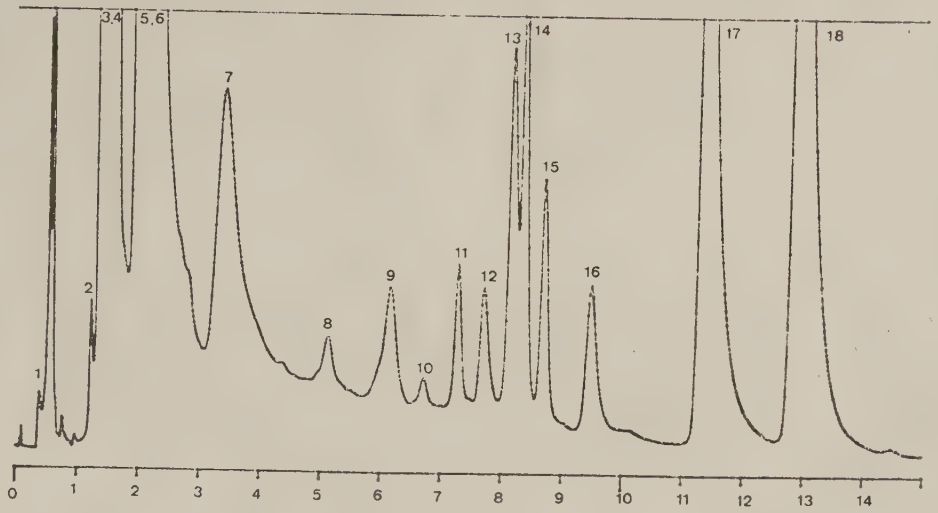
Date: 12/01/1982

RAT HEPATOCYTES
origin

AMINOPYRINE 10E-4 60'
sample id.



	Sample	Reference	Attn
1	.764	.818	5
2	1.227	1.280	7
3	1.576	1.452	161d
4	1.822	1.827	273
5	1.998	2.165	88
6	2.2.d	3.e34	123
7	3.423	3.e34	131
8	5.130	5.387	4
9	d.1.3	8.319	10
10	6.715	6.934	5
11	7.294	7.540	9
12	7.767	7.e59	8
13	8.175	d.2/e	14
14	8.364	8.552	38
15	8.758	9.----	17
16	9.431	9.691	14
17	11.376	12.070	59
18	12.8--	13.d-3	7b



analyte: HPLC - PRE-COLUMN
inj. vol.: 2ml/500ul/1ml
mobile ph.: 10 mM NaH2PO4 + 5%B
" B: ACETONITRILE
" FROM 0%B WITH 1%/min
" FLOW 2 ml/min
stat. ph.: Nucleosil 5-C 18
column: 4 x 125 mm (Bischoff)
run no.: #1 Bottle no. 1
remarks: AMINOPYRINE INCUBATED
" FOR 60 min WITH RAT
" HEPATOCYTES (10E-4 M)
" 3 E6 CELLS/ml
Inj.Time: 12:07
Attn [mAU]: 25.0 (811.0
Zero%: 3%
Signal: G: 7,8 Set M
Operator:

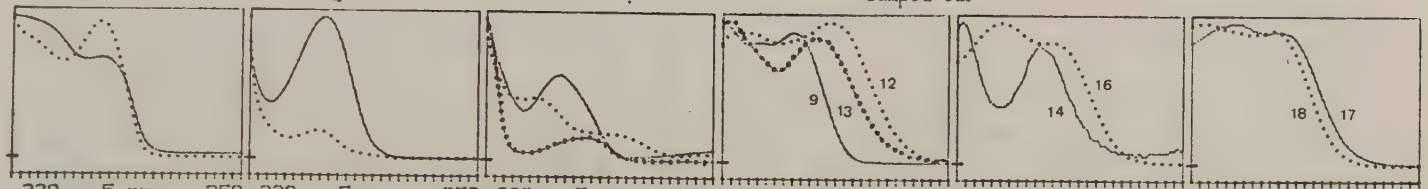
Peak	Height	Area
1	810.	4
2	2.2.	4
3	2..	4
4	2..	4
5	2..	4
6	2..	4
7	2..	13
e	2..	113

Abbildung 24a. Beschreibung im Text

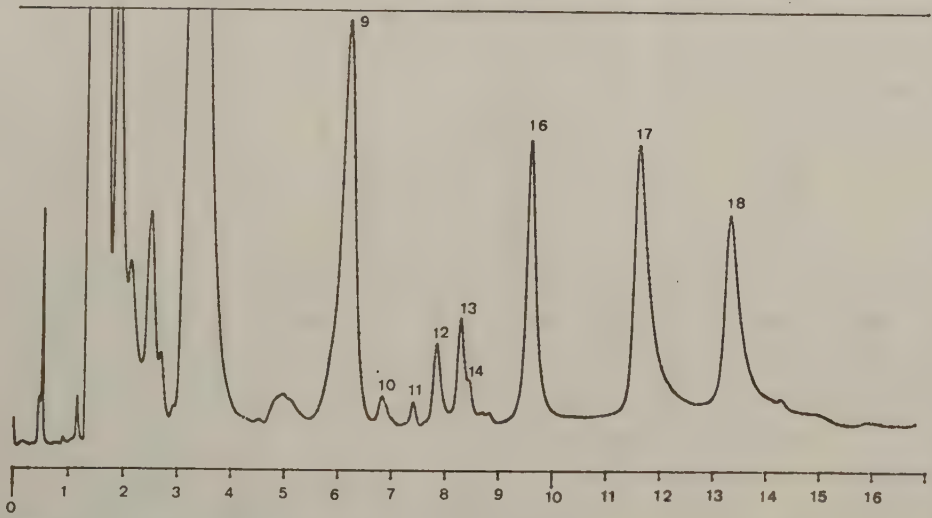
File: SERUM
Date: 11/29/1982

RAT PLASMA
origin

2 h p.o.
sample id.



220	5 nm	350	220	5 nm	350	220	5 nm	350	220	5 nm	350	220	5 nm	350	220	5 nm	350
Sample	Reference	Attn	Sample	Reference	Attn	Sample	Reference	Attn	Sample	Reference	Attn	Sample	Reference	Attn	Sample	Reference	Attn
1.293	.659	571	1.634	.659	137	2.494	.659	59	9 6.165	6.855	66	14 8.428	8.672	7	17 11.588	12.050	37
1.411	.659	509	2.125	.659	139	2.673	.659	39	12 7.837	8.672	12	16 8.580	8.962	44	18 13.314	13.882	24
						3.268	.659	1528	13 8.223	8.672	12						



Time [min]

analysis AMINOPYRINE & METAB.
inj. vol. 200 ul
mobile ph. A: 10 mM NaH2PO4+5%B
" (pH 7.5)
" B: ACETONITRILE
" GRADIENT : 1%/min (0%)
stat. ph. MN-5-C-18 (Bischoff)
column 4x125mm (MERCK) 2ml/m
run no. 1 bottle no. 1
remarks RAT PLASMA 2 h AFTER
" p.o. APPL. OF
" 20 mg/kg AMINOPYRINE
" (RAT 200g)

Inj.Time: 18:12
Attn [mAU]: 60.0 (435.9)
Zero%: 5%
Signal: B: 5.8 Set

Wavelength	
1	210, 4
2	220, 4
3	230, 4
4	200, 60
5	260, 4
6	280, 4
7	300, 4
8	550, 100

Operator:

Abbildung 24b. Beschreibung im Text

Die Spektren mit Verstärkungen bis herab zu 10 mAU/FS sind durch die durchgeführte Akkumulation sicher interpretierbar. Im Bereich von 2 bis 10 mAU wird die Qualität durch das vom Rechner limitierte [358] Signal/Rauschverhältnis etwas schlechter, sie gestattet jedoch die Zuordnung von Aminopyrin-ähnlichen Verbindungen mit hinlänglicher Genauigkeit:

Folgende Komponenten können somit aufgrund der UV-Spektren mit Aminopyrin in Verbindung gebracht werden: 3, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17 und 18.

Bei der Isolierung der Fraktionen zur massenspektrometrischen Strukturaufklärung wurde auf die früh eluierenden Komponenten 1-6 verzichtet. Die Zuordnung der Peaks durch Vergleich mit der Elutionszeit von Referenzsubstanzen führt zur folgenden Zuordnung:

Fraktion-Nr.	Substanz
9	4-Formyl- und 4-Acetylaminoantipyrin
16	4-Aminoantipyrin
17	4-Methylaminoantipyrin
18	Aminopyrin

Die Richtigkeit dieser Zuordnung zeigt der Vergleich von Massenspektren der Metabolitenfraktionen mit authentischen Referenzsubstanzen. Abbildung 25 stellt die Spektren der Referenzsubstanzen FAAP und AcAAP der Fraktion 9 (Abbildung 24a) gegenüber.

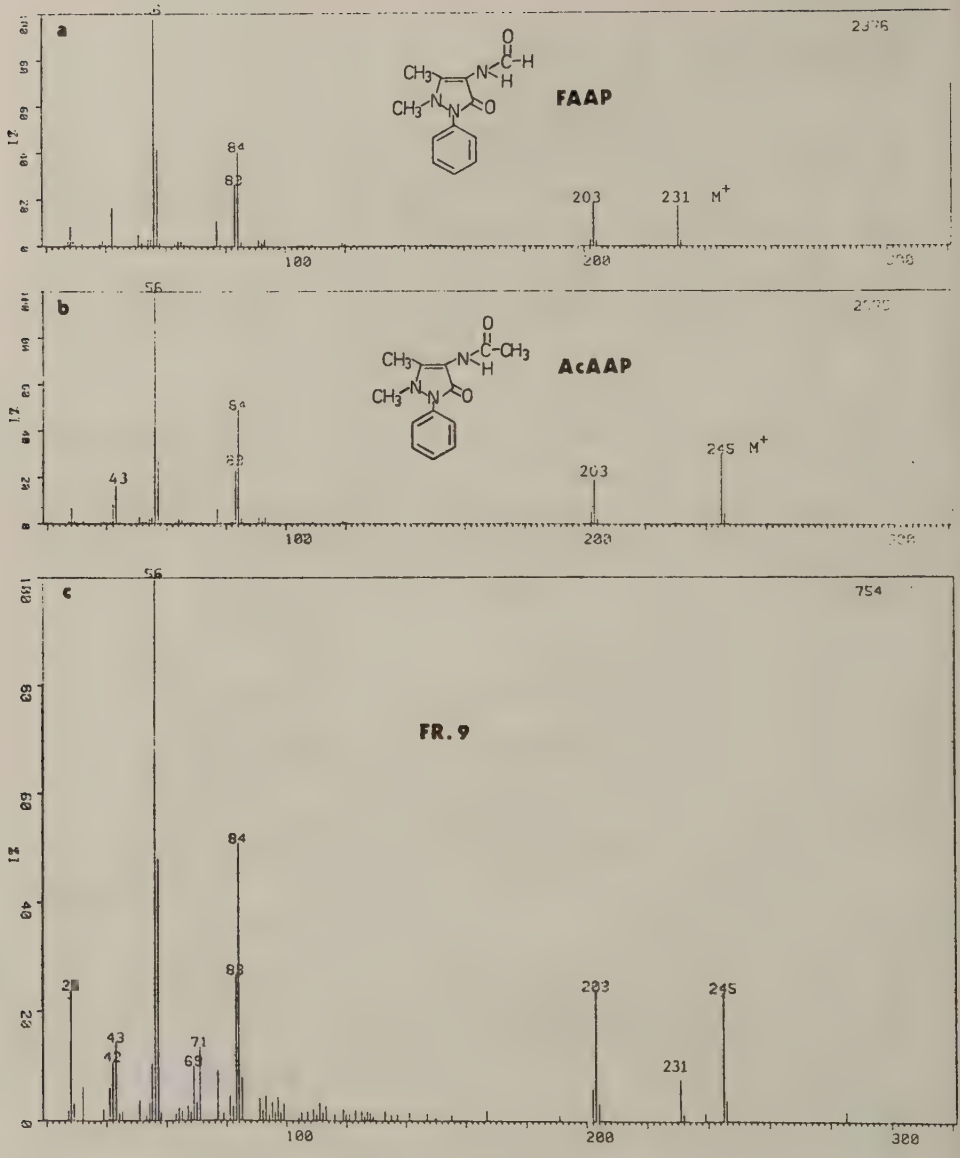


Abbildung 25: EI-Massenspektren der Aminopyrinmetaboliten Formylaminoantipyrin (a), Acetylaminoantipyrin (b) und Fraktion 9 (c). Direkteinlaß; EI = 70 eV (VG Micromass MM 7070F)

Massenzuordnung zu Abbildung 25

	m/e	Fragment
a)		
	231	M^+ Formylaminoantipyrin (FAAP)
	203	M^+-CO
	84	$H_3C-N=C-C=NH_2^+$
	83	$H_3C-N=C-C=N-H^+$
	56	$H_3C-N=C-CH_3^+$ aus 2,3-Dimethylsubstitution
b)		
	245	M^+ Acetylaminoantipyrin (AcAAP)
	203	M^+ - C=C=O; N-Acetyl-Substitution
	84, 88, 56	wie bei a)
c) Fraktion 9		
	245	M^+ von AcAAP
	231	M^+ von FAAP
	203	AcAAP-$H_2C=C=O$; FAAP-CO
	84, 83, 56	wie bei a)

Abbildung 26 zeigt die Massenspektren von Aminoantipyrin und der entsprechenden Metabolitenfraktion 16.

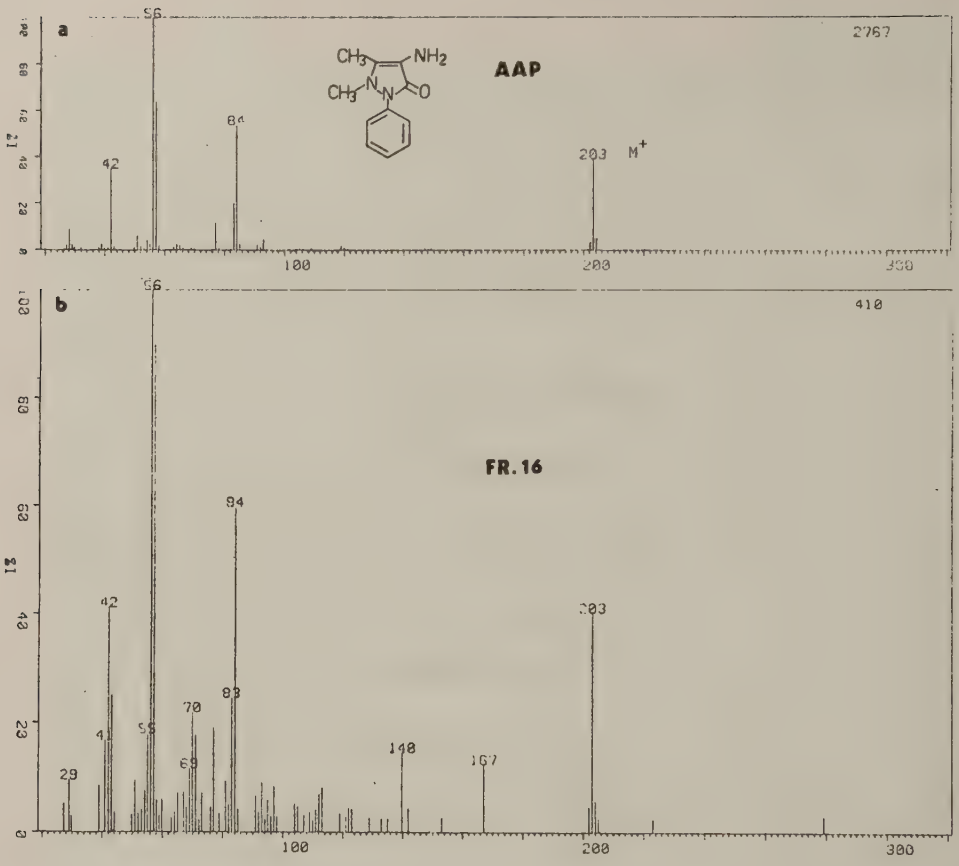


Abbildung 26: EI-Massenspektrum von Aminoantipyrin (AAP) (a) und Metabolitenfraktion 16 (b). Direkteinlaß: EI = 70 eV (VG Micromass MM 7070F).

Massenzuordnung zu Abbildung 26:

m/e	Fragment
203	M^+ Aminoantipyrin (AAP)
84	CH_3-N=C-C=NH_2 $]^+$
83	CH_3-N=C-C=N-H $]^+$
56	CH_3-N=C-CH_3 $]^+$, 2,3-Dimethylsubstitution

Ebenso wie bei FAAP, AcAAP und AAP können MAAP und Aminopyrin eindeutig durch Vergleich mit den Refernezspektren den Fraktionen 17 und 18 zugeordnet werden (Abbildung 27, 28).

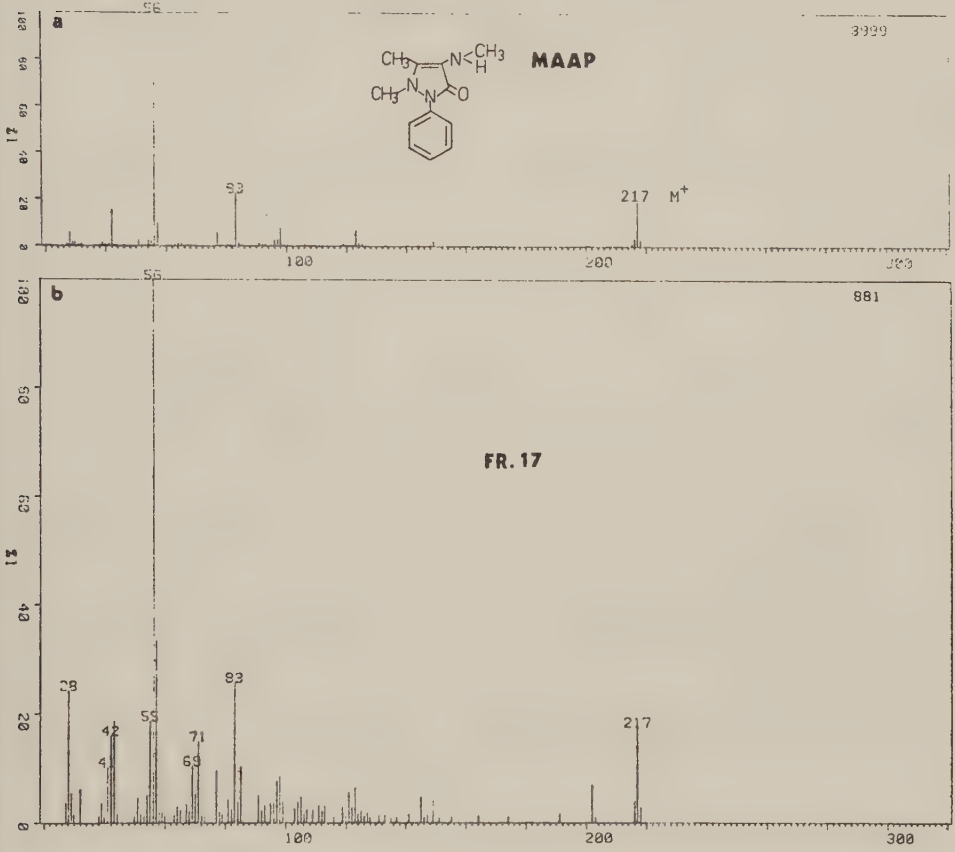


Abbildung 27: EI-Massenspektren von Methylaminoantipyrin (a) und Fraktion 17 (b). Direkteinlaß: EI = 70 eV (VG Micromass 7070F).

Massenzuordnung zu Abbildung 27:

m/e	Fragment
217	M^+
83	$CH_3-N=C-C=N-H^+$
56	$CH_3-N=C-CH_3^+$, 2,3-Dimethylsubstitution

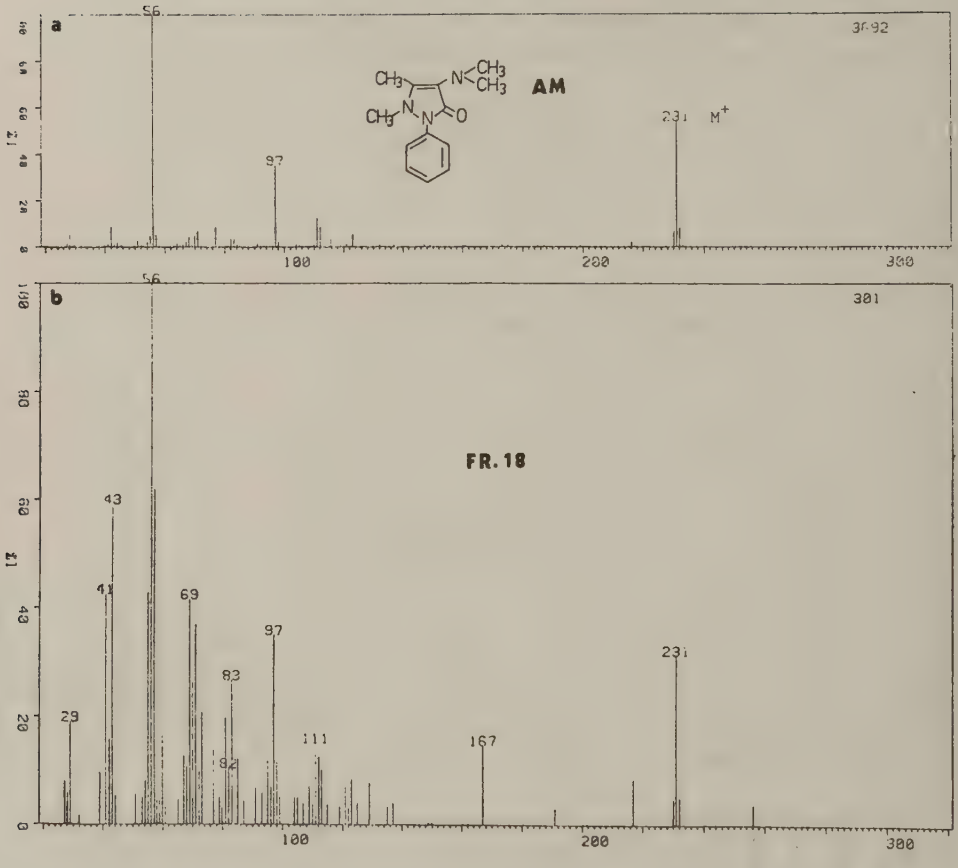


Abbildung 28: EI-Massenspektren von Aminopyrin (AM) (a) und Fraktion 18 (b). Direkteinlaß, EI = 70 eV (VG Micromass 7070F/ PDP-8).

Massenzuordnung zu Abbildung 28:

m/e	Fragment
231	M^+ Aminopyrin (AM)
97	M^+-Ø-N=C=O, $-CH_3$
56	CH_3-N=C-CH_3 $\urcorner^+$, 2,3-Dimethylsubstitution

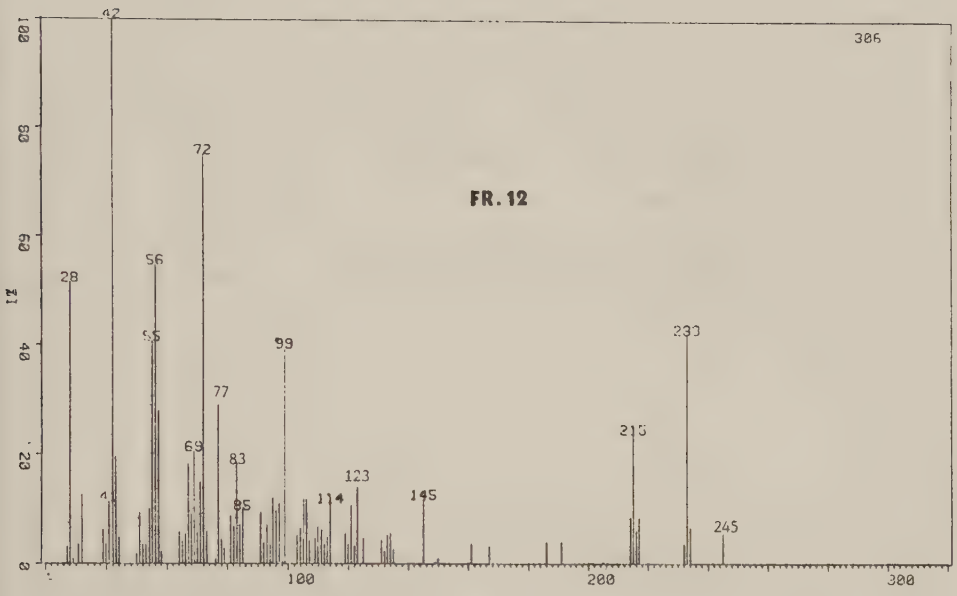
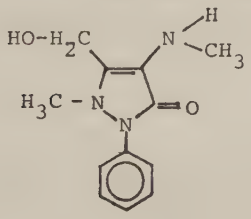


Abbildung 29: EI-Massenspektrum von Fraktion 12. Direkteinlaß, EI = 70 eV (Micromass 7070F)

Für Fraktion 12 kann aufgrund von chromatographischem Verhalten, UV-Spektren (siehe 7.2) und Massenspektrum die Struktur von 3-Hydroxymethyl-4-methylaminoantipyrin angenommen werden:



3-Hydroxymethyl-4-methylamino-antipyrin (m/e = 233)

Die Abspaltung von Phenylisozyanat führt zum Fragment 114 und weitere Abspaltung einer Methylgruppe zu m/e = 99. m/e = 72 entspricht in Analogie zu den obigen Referenzverbingungen der 2,3-Dimethylsubstitution ($HO-CH_2-C=N-CH_3^+$) und m/e = 42 entsteht aus diesem Fragment durch Abspaltung vom Formaldehyd. m/e = 77 identifiziert den monosubstituierten Phenylring und 215 könnte nach folgendem Mechanismus durch Wasserabspaltung aus der Ausgangsverbindung entstehen:

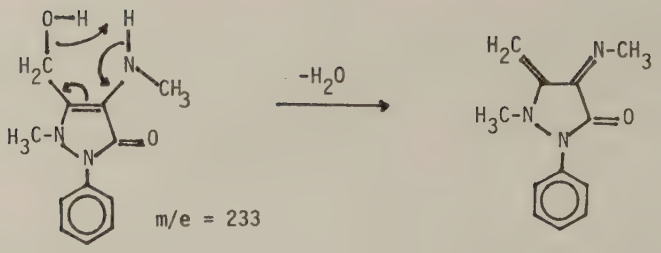
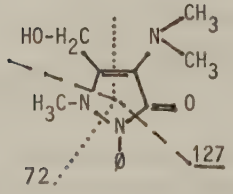
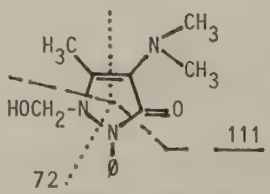


Abbildung 30 zeigt zwei aus verschiedenen Präparationen erhaltene Massenspektren der Fraktion 13.

Die Massenspektren der Fraktionen 13 und 13a weisen zunächst durch m/e = 247 auf ein monohydroxyliertes Aminopyrin hin. m/e = 72 und 42 entsprechen der hydroxylierten 2,3-Dimethylsubstitution analog zu Fraktion 12. m/e = 127 kann aus 3-Hydroxymethylaminopyrin und m/e = 111 aus 2-Hydroxymethylaminopyrin gemäß dem nachstehenden Fragmentierungsmuster entstehen; m/e = 77 entsteht durch den unverändert vorliegenden Phenylrest.



3-Hydroxymethylaminopyrin



2-Hydroxymethylaminopyrin

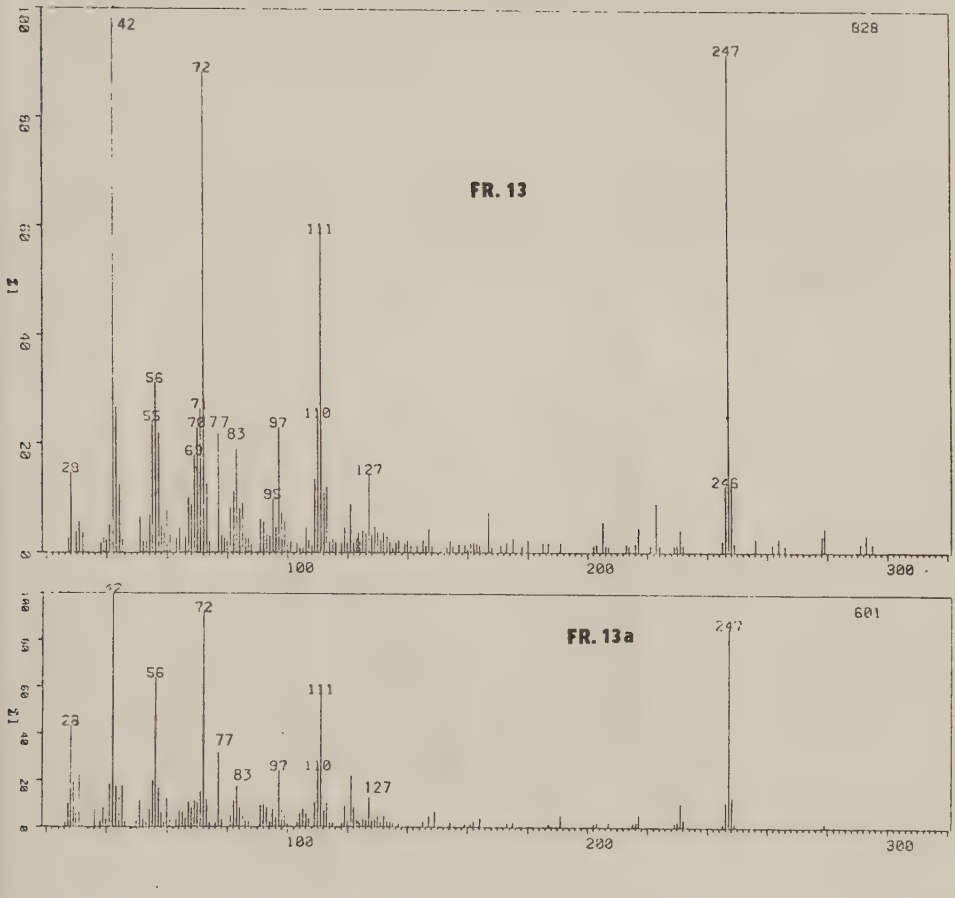


Abbildung 30: EI-Massenspektren der Aminopyrin-Metabolitenfraktion 13 aus zwei unterschiedlichen Inkubationsansätzen.

Das Fragment m/e = 111 kann mit der Annahme von 3-Hydroxymethylaminopyrin nicht befriedigend erklärt werden. Die Massenspektren von Fraktion 13 können somit einer Mischfraktion von 2- und 3-Hydroxymethylaminopyrin zugeschrieben werden.

Die Fraktionen 10, 11 und 15 können aufgrund der UV-Spektren (siehe 7.2 und Abbildung 24a) Aminopyrinmetaboliten zugeschrieben werden, liefern jedoch keine interpretierbaren Massenspektren.

Dieselbe Metabolitenzuordnung kann auch für Maus und Meerschweinchen übernommen werden, wie es exemplarisch an Abbildung 32 für Aminopyrin-Metaboliten aus Mäusehepatozyten gezeigt ist.

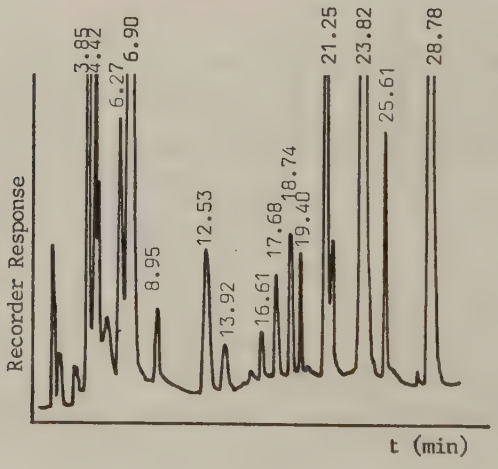


Abbildung 32: HPL-Chromatogramm der Trennung von Aminopyrin und seiner Metaboliten im Überstand einer 100 µmolaren Aminopyrininkubation nach 40 min Inkubationszeit. Injektion: 1 ml Wasser, 1 ml Überstand, 1 ml Wasser auf die Vorsäule. Sonstige Trennbedingungen wie in Abbildung 5. Peaks: 13.92 = 4-Formy- und 4-Acetylaminoantipyrin; 16.61 = 3-Hydroxymethyl-4-methylaminoantipyrin 17.68 = 3-Hydroxymethyl- und 2-Hydroxymethylaminopyrin; 18.74 = endogene Verbindung; 19.40 = nicht identifizierter Metabolit; 21.25 = 4-Aminoantipyrin; 23.82 = 4-Methylaminoantipyrin 25.61 = Aminopyrin; 28.78 = i-PAAP (interner Standard).

4.3.2 Biotransformation von Aminopyrin durch Humanmikrosomen

Aminopyrin wird durch Humanmikrosomen überwiegend N-demethyliert. Nach 60 min Inkubationsdauer findet sich überwiegend MAAP in der Suspension: Aminopyrin ist nicht mehr nachweisbar. Außer MAAP können nur noch FAAP bzw. AcAAP und AAP (vgl. Abbildung 3) nachgewiesen werden. Die Zuordnung der restlichen Metaboliten ist unsicher, bei dem Peak mit Retentionszeit 12.15 (Abbildung 33) kann es sich um MAAP-3-CH_2-OH handeln.

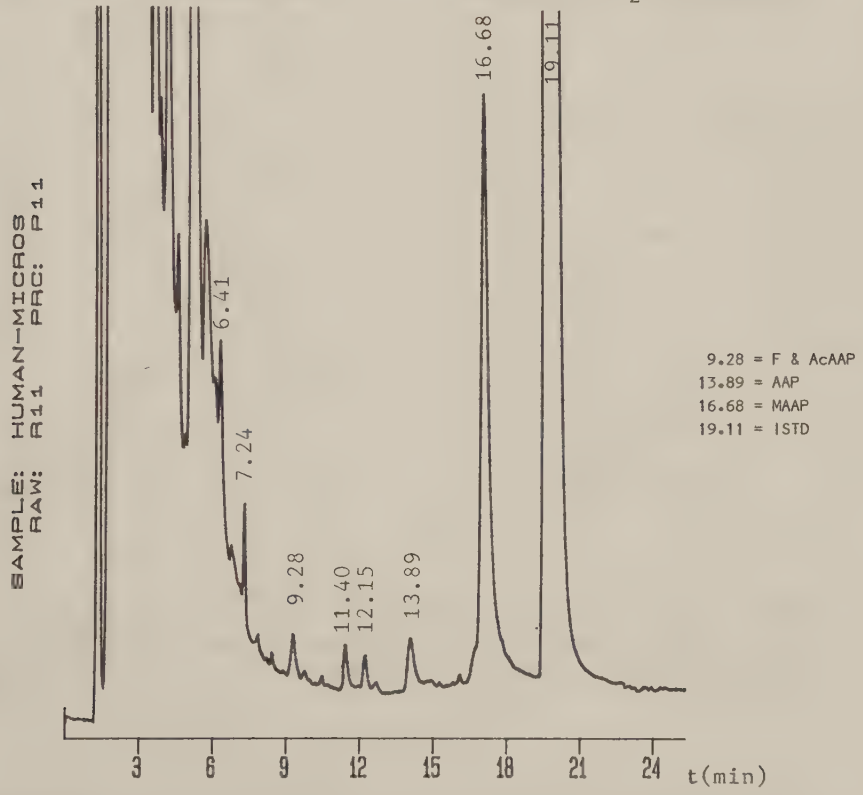


Abbildung 33: HPLC-Trennung der Biotransformationsprodukte von mit Aminopyrin inkubierten Humanmikrosomen (60 min, 300 µmolar). 9.75 mg mikrosomales Protein/ml; Säule 4 x 250 mm LiChrosorb RP-18, 5 µm; Eluent A: 10 mmol NaH_2PO_4 pH 7.5 (NaOH)/Acetonitril (95:5, v+v), Eluent B: Acetonitril; Fluß: 1.5 ml/min; Raumtemperatur; Vorsäule 4 x 40 mm Nucleosil 30-C-18; Injektion: 1 ml Wasser, 100 µl mikrosomaler Überstand, 1 ml Wasser auf die Vorsäule; Chromatograph: Konstantflußpumpe M 600/200 und Gradientenformer (Gynkotek); Injektionsventil Modell 7125 Rheodyne); Detektion bei 260 nm (LC-75, Perkin Elmer).

4.4 In vitro-Biotransformation von Lonazolac

Die Biotransformation von Lonazolac wurde bereits in der Diplomarbeit ausführlich untersucht. Die Vorsäulentechnik gestattet nunmehr die Untersuchung niedrigerer Inkubationskonzentrationen, die in diesem Falle zu einem nur unwesentlichen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit führen (Abbildung 34).

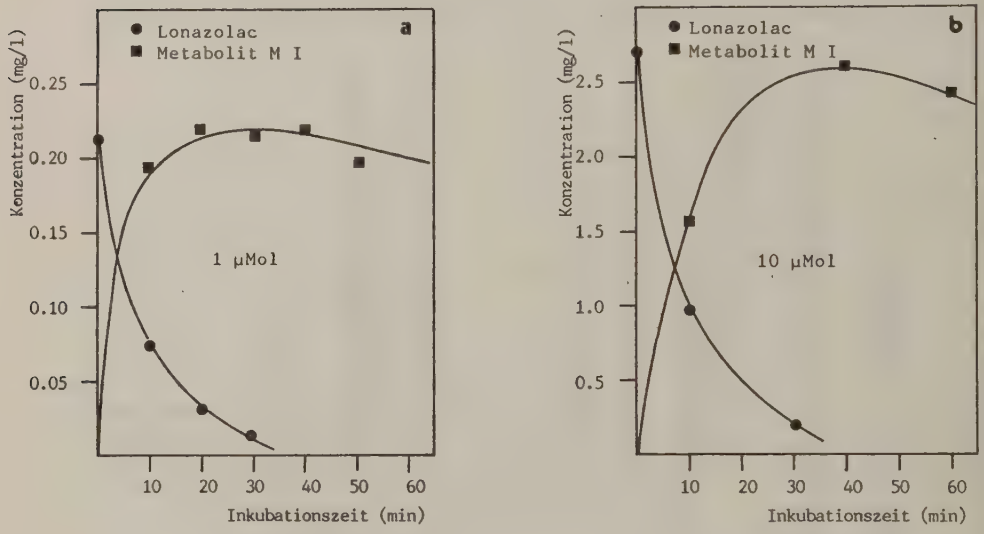


Abbildung 34: Biotransformation von Lonazolac bei 1 µmol (a) und 10 µmol (b). Inkubationskonzentration durch isolierte Hepatozyten einer männlichen, gefütterten Ratte (gleiche Zellpräparation wie in Abbildung 18).

Weiterhin ermöglicht die Vorsäulentechnik die Abtrennung grösserer Mengen biologischer Matrix, wodurch z.B. der Einfluß der Serumalbuminbindung auf die Biotransformation untersucht werden kann. Lonazolac wird stark an Serumalbumin gebunden. Diese Serumalbuminbindung kann die schnelle Verstoffwechselung bei

der Leberpassage ("first-pass-effect") verhindern, da das gebundene Lonazolac für hepatisches Gewebe nicht extrahierbar sein kann. Abbildung 35 zeigt den Einfluß von Albumin im Inkubationsmedium auf die Kinetik der Biotransformation von Lonazolac.

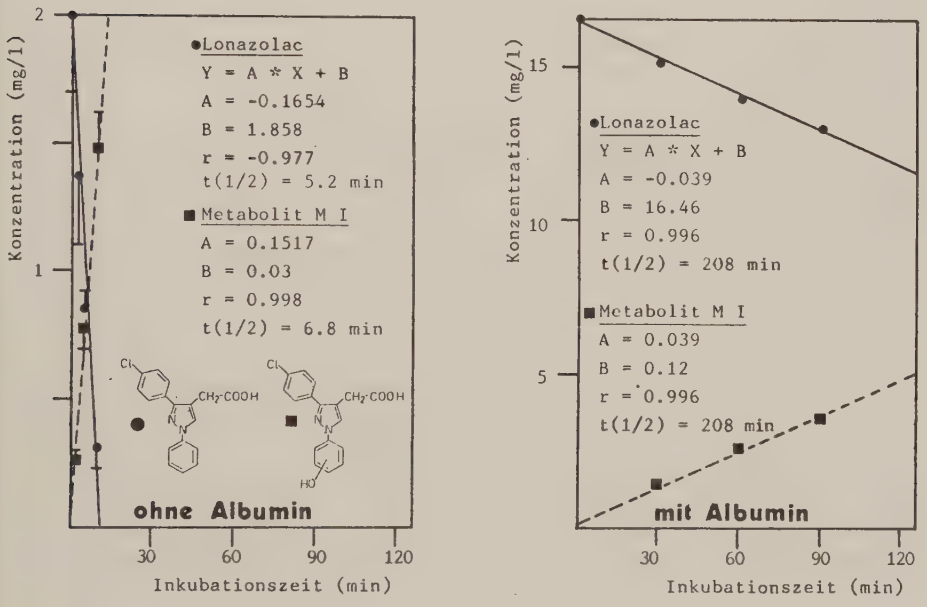


Abbildung 35: Kinetik der Biotransformation von Lonazolac in Abhängigkeit von der Serumalbuminbindung. Ohne Albumin: Mittelwerte aus 4 Inkubationen mit 0.5 Gew.% Rinderserumalbumin im Inkubationsmedium.

Die Biotransformation von Lonazolac wurde ebenfalls an der rezirkulierend perfundierten Leber mit Gallenableitung untersucht.

Abbildung 36 zeigt die Metabolisierungskinetik von Lonazolac in der rezirkulierend perfundierten Leber mit Galleableitung bei Perfusion mit bzw. ohne Albuminzusatz. Ohne Albumin liegen die Konzentrationen von Lonazolac und seinem Metaboliten M I im Perfusat und in der abgeleiteten Galle wesentlich niedriger als bei Albuminzusatz. Albumin verlängert hier die Halbwertszeiten von Lonazolac im Vergleich zu den obigen Hepatozytenexperimenten nur unwesentlich.

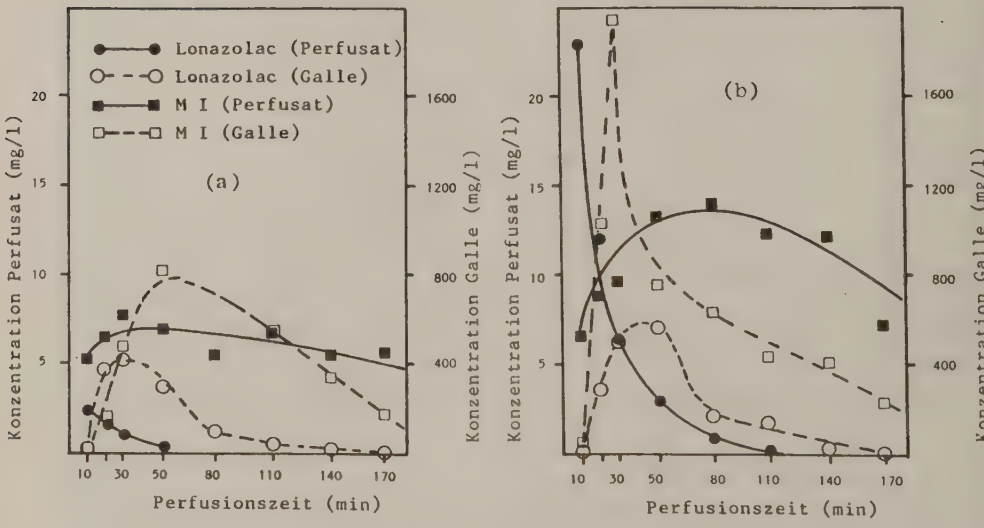
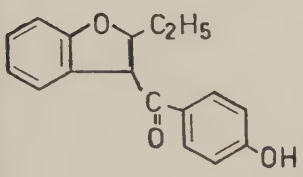


Abbildung 36: Metabolisierungskinetik von Lonazolac in der rezirkulierend perfundierten Leber von männlichen SD-SIV-50-Ratten (ca. 200 g) ohne (a) bzw. mit 0.5 Gew.% Albumin (b) im Perfusionsmedium bei einem Perfusionsfluß von ca. 30 ml/min (Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten).

4.5 Biotransformation von Benzaron in der Ratte



BENZARON

Die Biotransformation von Benzaron wurde untersucht in isolierten Rattenhepatozyten und in der bei wachen Ratten abgeleiteten Galle nach oraler Applikation von 20 mg/kg Benzaron. Metabolitenfraktionierung und anschließende Massenspektrometrie von direkt injizierter Rattengalle führt durch die Anwesenheit von biologischem Material zu nicht eindeutig interpretierbaren Massenspektren. Hochauflösungsmessungen an diedie Vorsen Proben bestätigen jedoch das Vor-Vorhandensein mindestens eines hydroxylierten Benzaronmetaboliten (MG = berechnet für $C_{17}H_{14}O_4$ = 282.0892, gemessen 282.0893). Um die Biotransformation von Benzaron genauer untersuchen zu können, wurden Rattenhepatozyten mit 100 µmol Benzaron 60 min inkubiert, die entstandenen Metaboliten mit der Vorsäulentechnik von der biologischen Matrix befreit und angereichert und nach der HPLC-Trennung für die Massenspektroskopie fraktioniert (Abbildung 38). Der Vergleich der Massenspektren von 3'-Hydroxybenzaron mit Fraktion 4 sowie die gleiche Laufzeit der Referenzverbindung mit Fraktion 4 lassen dieser die Struktur des 3'-Hydroxybenzaron zuordnen. Fraktion 3 weist ebenfalls das Molekulargewicht des einfach hydroxylierten Benzarons auf, jedoch tritt hier im Unterschied zu 3'-Hydroxybenzaron das Schlüsselion 121 auf, was auf einen Cumaron- hydroxylierten Metaboliten hinweist. Fraktion 2 liefert ein ähnliches Massenspektrum mit dem Schlüsselion 121, was wiederum auf eine Cumaronhydroxylierung schließen läßt. m/e = 173 deutet allerdings auf eine Mischfraktion mit einem phenylhydroxylierten Metaboliten. Eine genauere Lokalisierung der Hydroxylierungspositionen ist mit der Massenspektrometrie nicht möglich; andererseits sind die im µg-Bereich isolierten Mengen so aussagekräftigen Methoden wie der Kernresonanzspektroskopie nicht zugänglich. Die Abbildungen 37 - 42 zeigen Chromatogramme und Massenspektren von Benzaron und seinen Metaboliten.

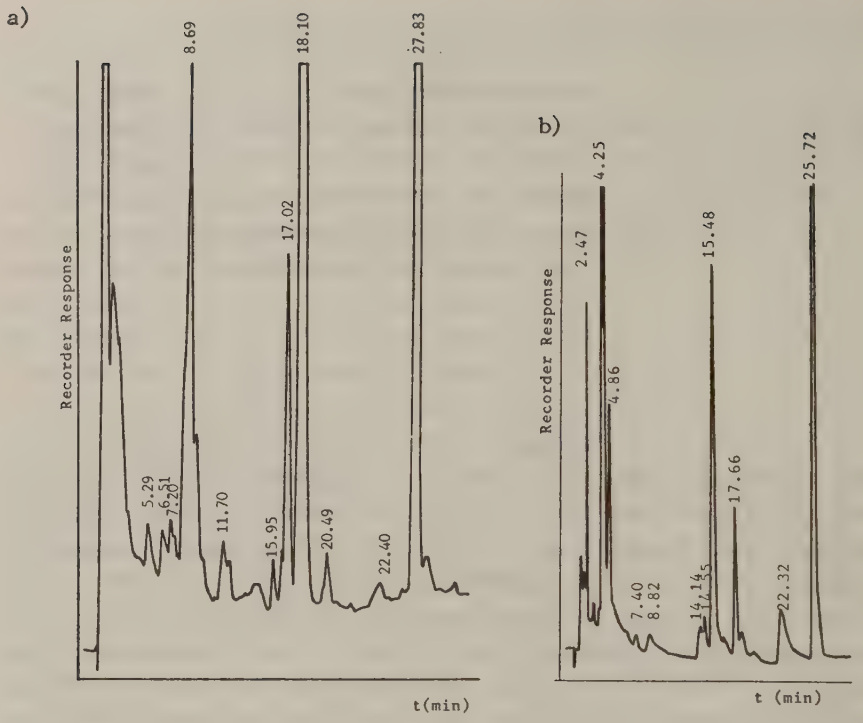


Abbildung 37: a) HPLC-Trennung von Benzaron und seinen Metaboliten in Rattengalle 5 Stunden nach oraler Applikation von 20 mg/kg. Säule: 4.6 x 125 mm LiChrosorb RP-8, 5 µm (Knauer), Eluent A: Wasser pH 2.7 (H_3PO_4), Eluent B: Acetonitril; Gradient: 0 bis 2 min 20% B, von 2 bis 22 min auf 40% B und von 22 bis 30 min auf 60% B linear ansteigend; Fluß: 1 ml/min; Raumtemperatur; Injektion: 20 µl Galle; Chromatograph: Hewlett-Packard 1084 B; Detektion: UV bei 290 nm; Peaks aufgrund der Massenspektren bei gleicher Retentionszeit: 17.02 = Cumaron-hydroxyliertes Benzaron (I), 18.10 = Cumaron-hydroxyliertes Benzaron (II), 22.40 = 3'-Hydroxybenzaron, 27.83 = Benzaron.

b) HPLC-Trennung von Benzaron und seinen Metaboliten im Überstand einer 100 µmolaren Inkubation an Rattenhepatozyten nach 60 min. Trockengewicht: 17.6 mg/ml; Protein: 5.1 mg/ml; 2.7×10^6 Zellen/ml; Vitalität (mikroskopisch) nach 30 min Inkubation: 86%; Injektion: 1 ml Wasser, 1 ml Überstand, 1 ml Wasser auf die Vorsäule; Trennbedingungen wie bei a); Chromatograph: Gradientenformer M 2500 und Konstantflußpumpe M 600/200 (Gynkotek); Injektionsventil Modell 7125 (Rheodyne); Detektion: UV bei 290 nm.

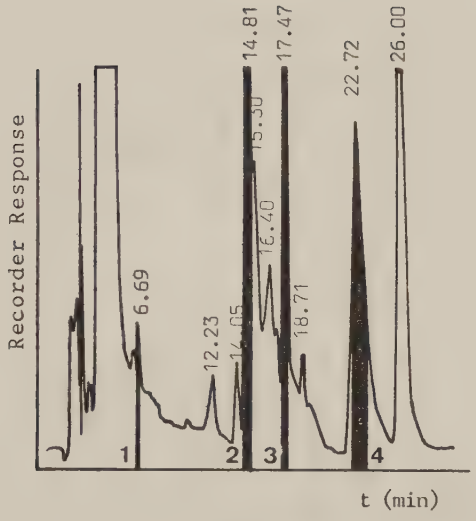


Abbildung 38: Semipräparative Isolierung von Benzaronmetaboliten aus dem Überstand einer 100 µmolaren Benzaroninkubation an Rattenhepatozyten (Inkubation und Trennbedingungen wie in Abbildung 37b). Injektion: 1 ml Wasser, 5 ml Überstand, 1 ml Wasser auf die Vorsäule. Die gesammelten Fraktionen sind schwarz eingezeichnet.

Abbildung 39: EI-Massenspektrum von Benzaron (a) und 3'-Hydroxybenzaron (b) (Referenzsubstanzen). Direkteinlaß EI = 70 eV (VG Micromass 7070F/PDP-8).

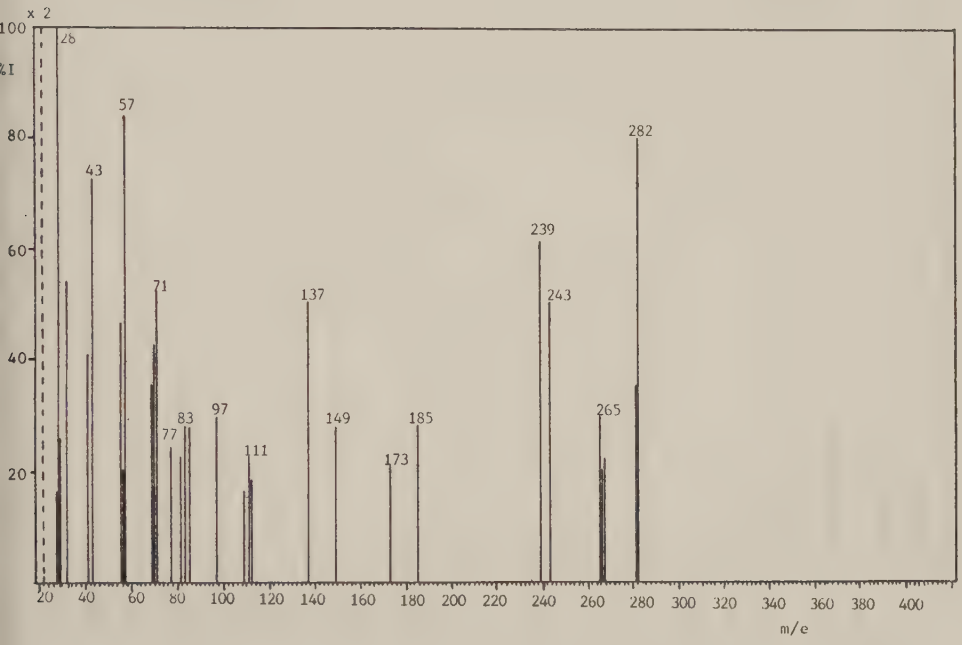


Abbildung 40: EI-Massenspektrum von Fraktion 4 (Untergrund korrigiert). Aufnahmebedingungen wie in Abbildung 39. Strukturvorschlag: 3'-Hydroxybenzaron (siehe Text).

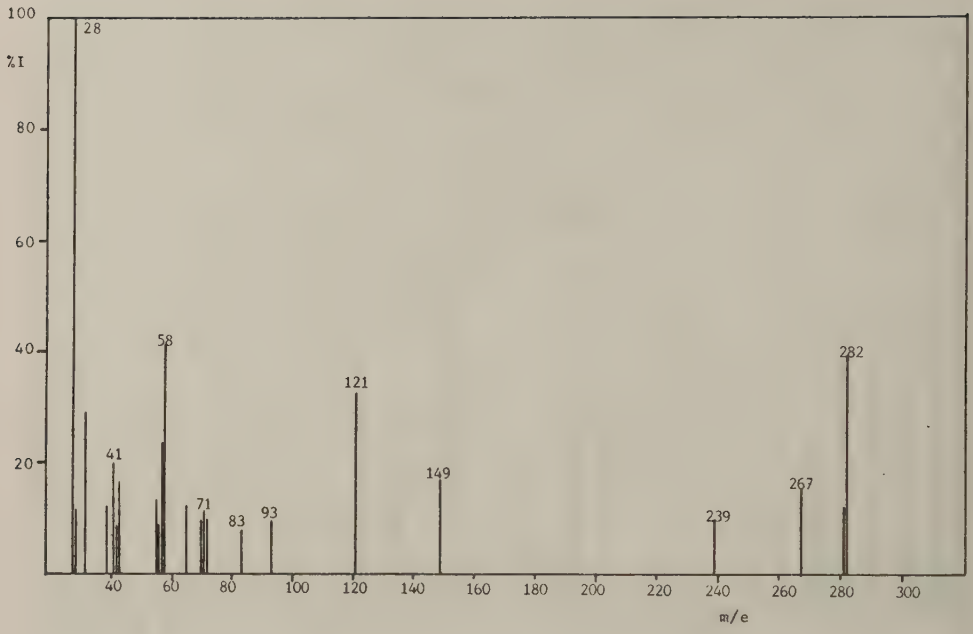
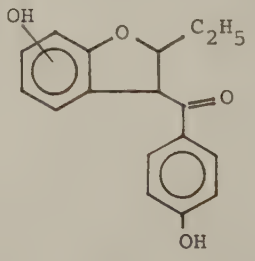


Abbildung 41: EI-Massenspektrum von Fraktion 3 (Untergrund korrigiert). Aufnahmebedingungen wie in Abbildung 39.

Massenzuordnung zu Abbildung 41



m/e	Fragment
282	M^+
267	M^+-CH_3
149	Weichmacher
121	HO-Ø-C=O $\rceil^+$, Monohydroxyphenyl
93	HO-Ø $\rceil^+$, Monohydroxyphenyl

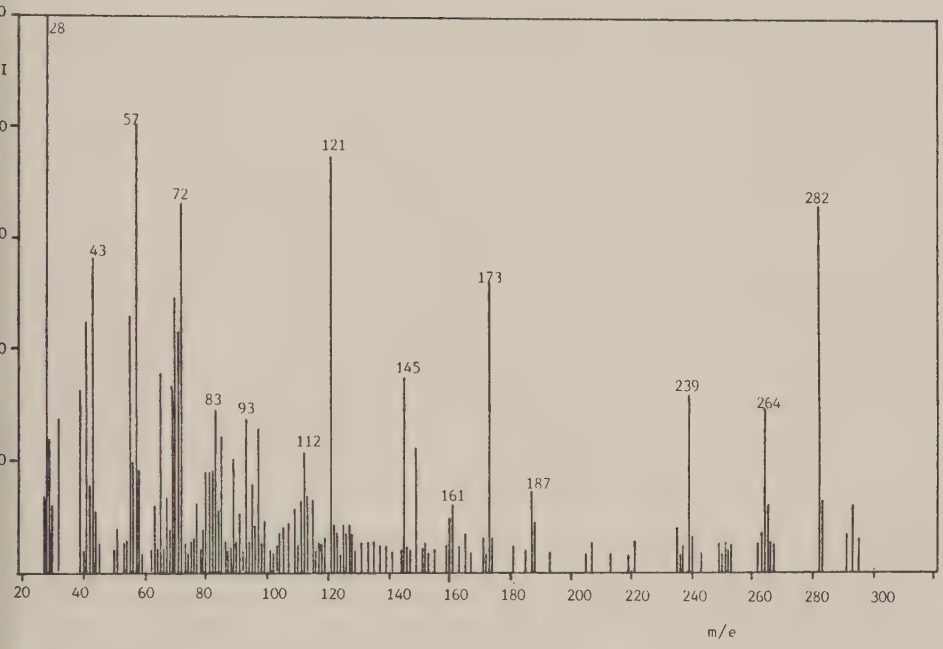
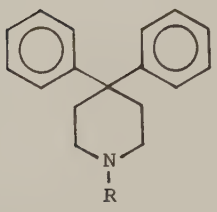


Abbildung 42: EI-Massenspektrum von Fraktion 2. Aufnahmebedingungen wie in Abbildung 39; Mischfraktion zweier Benzaronmetaboliten; Diskussion siehe Text.

4.6 Biotransformation N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine durch isolierte Rattenhepatozyten

Das unterschiedliche pharmakodynamische Verhalten verschiedener N-alkylsubstituierter Diphenylpiperidine ließ als Ursache Verschiedenheiten in der Biotransformation vermuten, was am Modellsystem isolierter Rattenhepatozyten mit Hilfe der Vorsäulentechnik untersucht wird. Folgende Verbindungen des allgemeinen Typs mit R = CH_3; n-C_3H_7; -CH-$(CH_3)_2$; -n-C_4H_9; -$CH(CH_3)(C_2H_5)$; -CH_2-CH-$(CH_3)_2$; -$C(CH_3)_3$; -CH_2-$C(CH_3)_3$; -$C(CH_3)_2$-(C_2H_5); -n-C_6H_{13}; -CH_2-C_6H_5 und H werden untersucht. Ein typisches Chromatogramm der Trennung von i-Propyl-4,4-diphenylpiperidin und seinem N-dealkylierten Metaboliten wurde bereits in Abbildung 14 dargestellt.



Die Untersuchung erfolgt an Zellpräparationen von vier männlichen, gefütterten SD-SIV-50-Ratten, wobei die Zellen einer Präparation jeweils separat mit allen obigen Diphenylpiperidinen inkubiert werden (Parallelinkubation). Die folgenden Abbildungen fassen die Ergebnisse zusammen. Die Muttersubstanz ist jeweils mit dem Symbol ◘ , das N-Dealkylierungsprodukt 4,4-Diphenylpiperidin mit ○ gekennzeichnet.

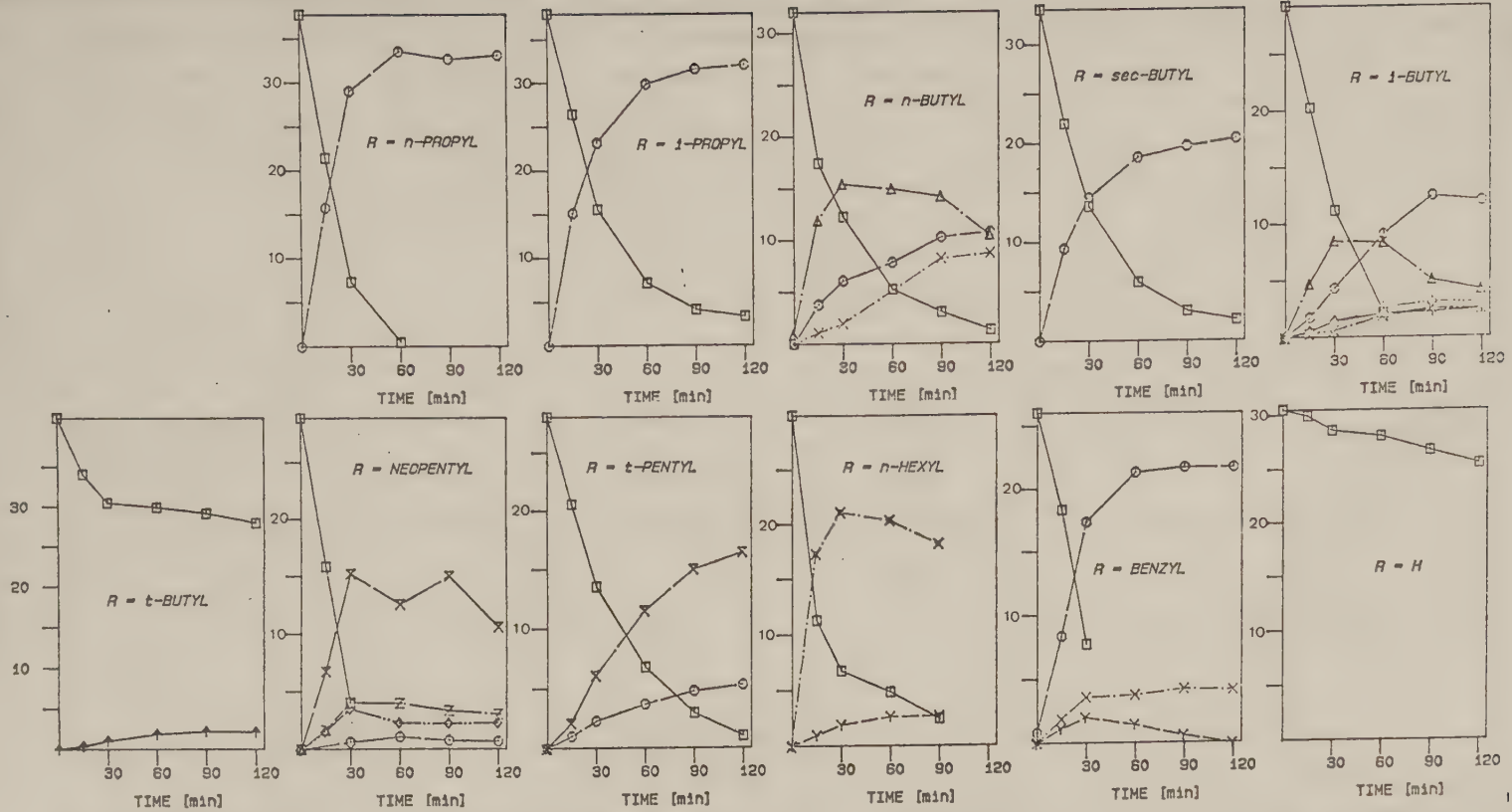


Abbildung 43: Normierte Darstellung der Biotransformation N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine durch Rattenhepatozyten einer männlichen, gefütterten SD-SIV-50 Ratte (Ratte 1), 200g; Inkubationskonzentrationen ca. 100 µmolar; Trockengewicht 10.2 mg/ml; Protein 3.41 mg/ml Vitalität (mikroskopisch) nach 30 min: 90%.

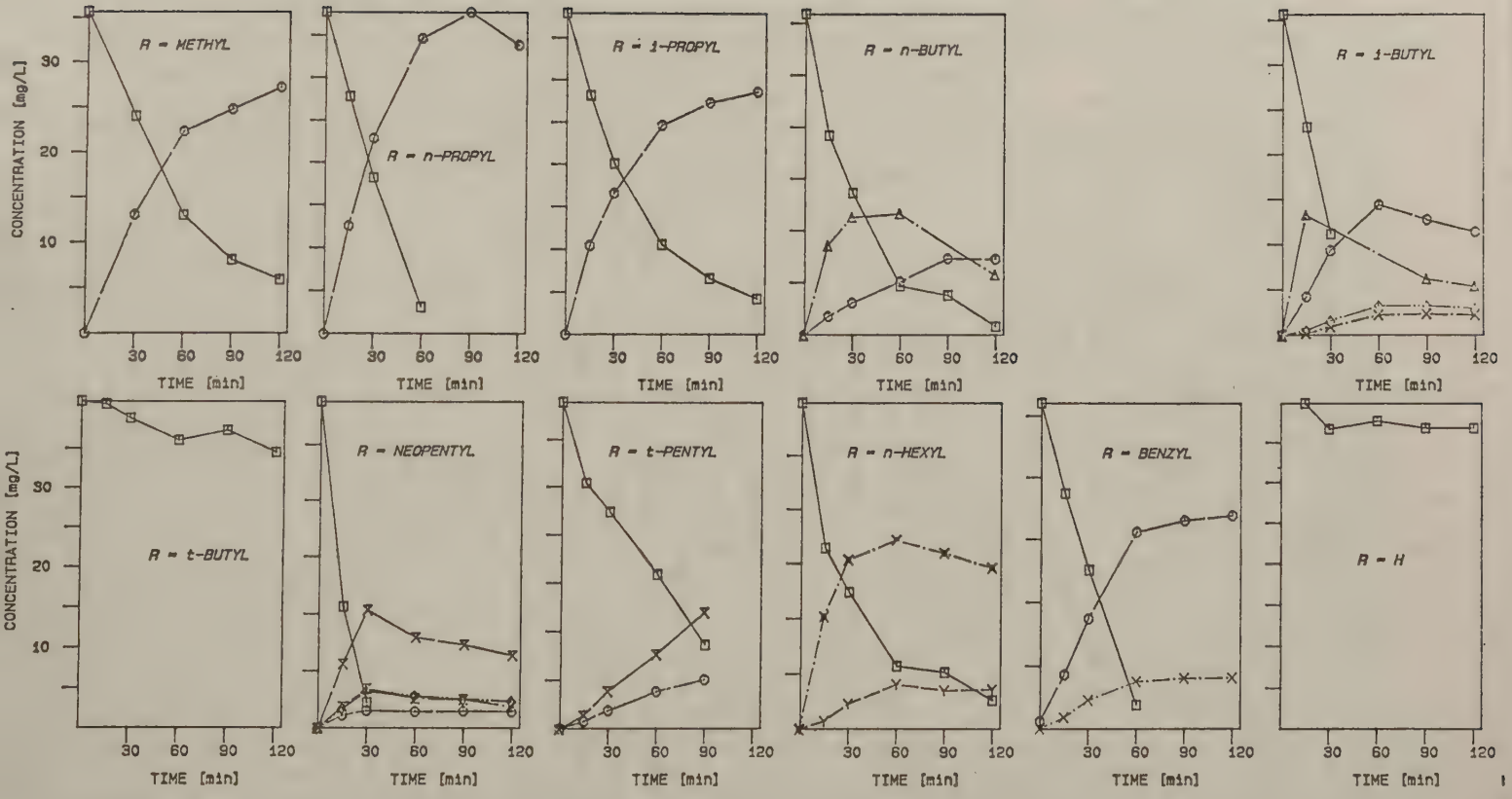


Abbildung 44: Normierte Darstellung der Biotransformation N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine durch Rattenhepatozyten einer männlichen, gefütterten SD-SIV-50 Ratte (Ratte 2), 200g; Inkubationskonzentrationen ca. 100 µmolar; Trockengewicht 8.38 mg/ml; Protein 3.57 mg/ml Vitalität (mikroskopisch) nach 30 min: 90%.

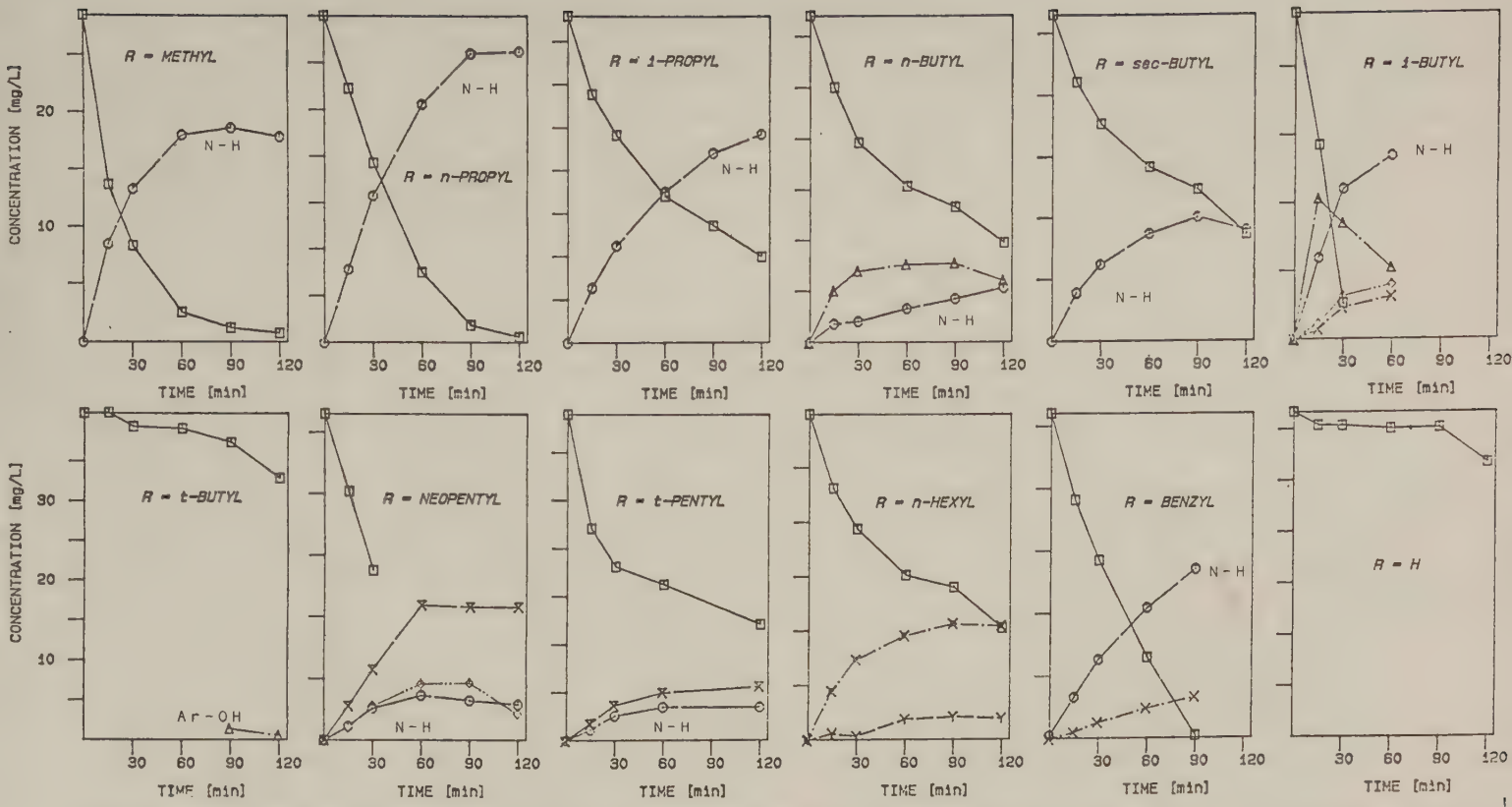


Abbildung 45: Normierte Darstellung der Biotransformation N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine durch Rattenhepatozyten einer männlichen, gefütterten SD-SIV-50 Ratte (Ratte 3), 200g; Inkubationskonzentrationen ca. 100 µmolar; Trockengewicht 7.72 mg/ml; Protein 2.31 mg/ml Vitalität (mikroskopisch) nach 30 min Inkubation: 92%.

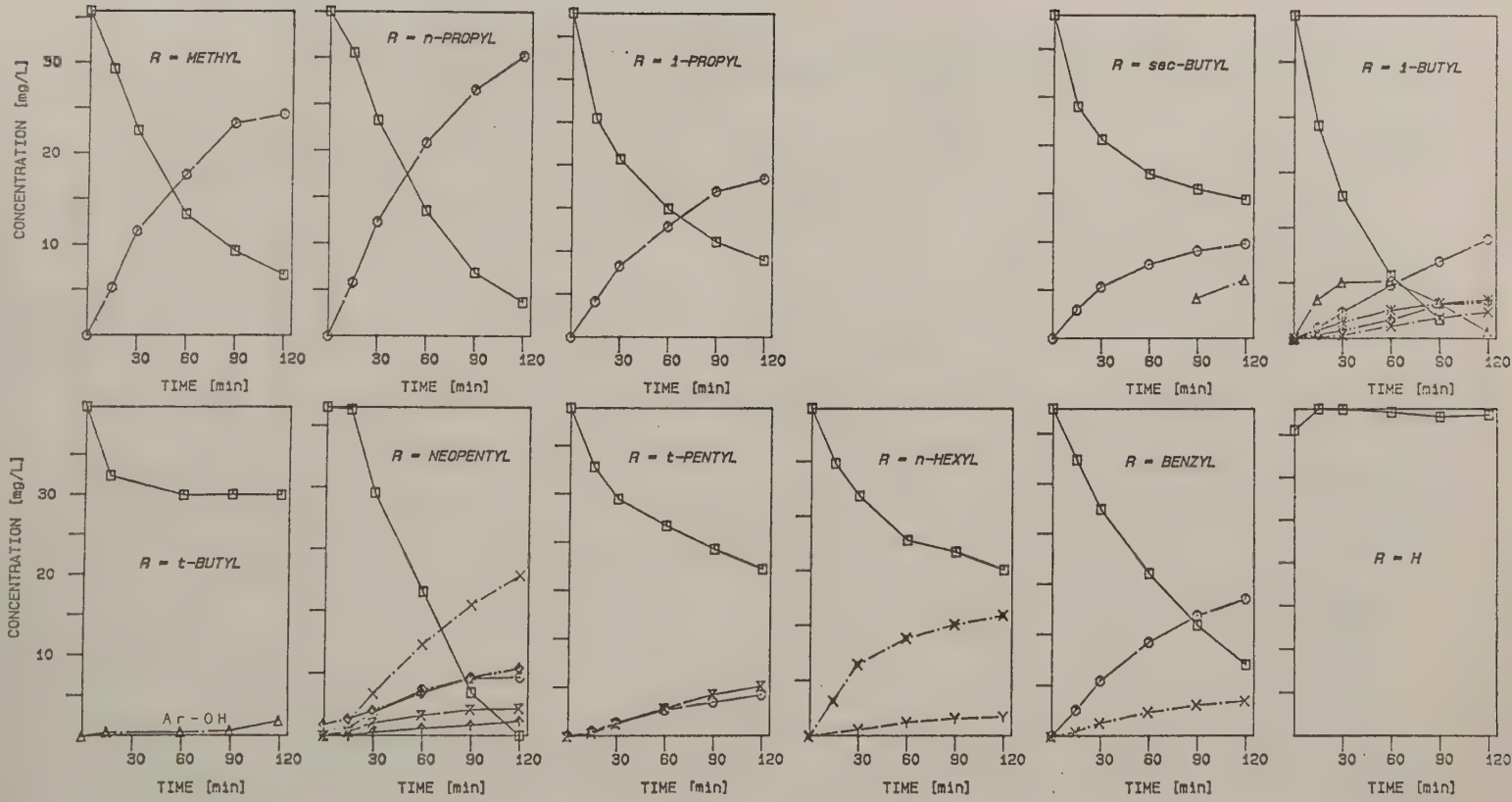


Abbildung 46: Normierte Darstellung der Biotransformation N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine durch Rattenhepatozyten einer männlichen, gefütterten SD-SIV-50 Ratte (Ratte 4), 200 g; Inkubationskonzentrationen ca. 100 µmolar; Trockengewicht 6.42 mg/ml; Protein 1.79 mg/ml Vitalität (mikroskopisch) nach 30 min Inkubaion: 95%.

5. DISKUSSION

Die entwickelte HPLC-Vorsäulentechnik erweist sich als ein reproduzierbares und einfaches Verfahren zur Untersuchung von Fremdsubstanzen und ihrer Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten. Da sie sich auf leicht kontrollierbare und optimierbare Injektionsschritte beschränkt, können die Suche nach einem geeigneten internen Standard sowie zeitaufwendige Probenvorbereitungen durch Extraktion entfallen. Die dargestellten Anwendungsbeispiele zeigen die Anwendbarkeit dieser Technik sowohl als Routinemethode zur Plasmaspiegelbestimmung von Pharmaka, als auch zu Biotransformationsuntersuchungen. Aus diesem Grunde wurde sie in dieser Arbeit bei der Untersuchung der Biotransformation von Aminopyrin, Lonazolac, Benzaron und N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine fast ausschließlich angewandt.

5.1 Isolierte Hepatozyten von Ratte, Maus und Meerschweinchen als Modellsystem für die in vivo-Biotransformation von Aminopyrin

In allen drei untersuchten Spezies ist der Hauptweg der Funktionalisierungsreaktionen die N-Demethylierung der 4-ständigen Dimethylaminogruppe sowohl in vitro als auch in vivo (vgl. Abbildungen 18 - 23) zunächst zum Methylaminoantipyrin (MAAP) und von diesem zum Aminoantipyrin (AAP).

Diese Reihenfolge ist aus der Abnahme des zunächst gebildeten MAAP (vgl. Abbildungen 19a, 21a und 22) in isolierten Hepatozyten ersichtlich. Die Interpretation der in vivo-Verhältnisse wird durch die für die einzelnen Metaboliten unterschiedlichen Ausscheidungsraten etwas erschwert, doch läßt der zeitliche Verlauf der Metabolitenkonzentrationen in Plasma nach oraler Applikation (z.B. Abbildung 20) auf die gleiche Reihenfolge

schließen. Die quantitativen Verhältnisse der Bildung von Aminoantipyrin können jedoch dessen hohe Plasmakonzentrationen nicht erklären. Drei Erklärungsmöglichkeiten hierfür bieten sich an:

1.) Die geringe Bildung von Aminoantipyrin (AAP) ist ein Artefakt der Zellpräparationstechnik,
2.) AAP wird überwiegend extrahepatisch gebildet oder
3.) die Bildung von AAP wird kompetitiv durch Aminopyrin oder seine Metaboliten gehemmt.

Zu 1.:
Wenn die geringe AAP-Bildung ein Artefakt der Zellpräparationstechnik ist, sollte die Biotransformationskinetik in der perfundierten Leber anders als in isolierten Hepatozyten verlaufen.

Kampffmeyer [276] untersuchte die Biotransformation an isolierten, rezirkulierend perfundierten Rattenlebern; seine Ergebnisse sind in Abbildung 43 denen an isolierten Hepatozyten gegenübergestellt. Wie daraus ersichtlich ist, metabolisiert auch die perfundierte Leber Aminopyrin hauptsächlich zu Methylaminoantipyrin und nur zum geringen Teil zu AAP. Die Übereinstimmung dieser Ergebnisse läßt daher einen Artefakt - produziert durch die Zellpräparation - ausschließen.

Zu 2.:
Aufgrund der Ergebnisse von Lauterburg und Bircher [279] mit 2/3 hepatektomierten Ratten ergeben sich für Aminopyrin ca. 25% extrahepatische Metabolisierung. Obwohl extrahepatisches Gewebe nur geringfügige mikrosomale N-Demethylierungsaktivität aufweist [360], könnte das gesamte extrahepatische Gewebe doch zur merklichen Demethylierung von Aminopyrin beitragen; auch Polysubstratmonooxygenase-unabhängige N-Demethylierungsmechanismen - die in 3.1.3 diskutiert wurden - könnten einen

wesentlichen Beitrag hierzu liefern. Es gibt jedoch keine Anhaltspunkte dafür, daß Methylaminoantipyrin extrahepatisch schneller als Aminopyrin dealkyliert wird, wodurch die Hypothese der extrahepatischen Bildung von AAP unwahrscheinlich ist.

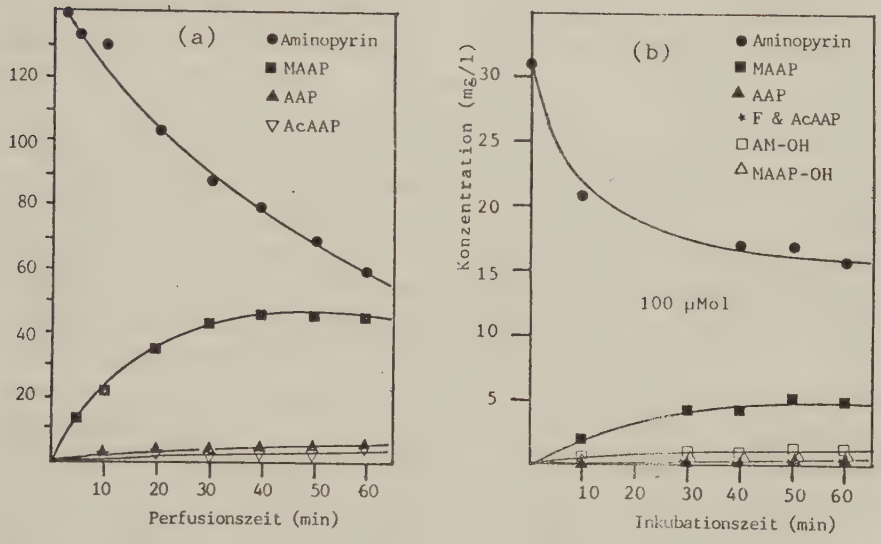


Abbildung 47: Biotransformationskinetik von Aminopyrin
a) in isolierten, rezirkulierend perfundierten Lebern männlicher, gefütterter SD-SIV-50-Ratten (160-220 g) nach Daten von Kampffmeyer (276). Anfangskonzentration: 870 µmol; mittleres Lebergewicht 9 g; Perfusionsmedium: Protein-freier Krebs-Henseleit-Puffer; Mittelwerte aus sechs Experimenten;
b) in isolierten Hepatozyten einer männlichen, gefütterten SD-SIV-50-Ratte (200 g) entsprechend Abbildung 18a.

Zu 3.:
In vivo-Untersuchungen an Ratten [290] zeigen für die N-Demethylierung von Aminopyrin eine biphasische Biotransformationskinetik, wobei zunächst die schnelle Demethylierung der von Aminopyrin und die langsame der von MAAP zugeschrieben wurde.

Roots et al. [361] zeigten jedoch, daß die langsame Komponente nicht mit der von MAAP identisch ist, sondern sich darin eine komplexe Information widerspiegelt, die auch durch die weiterhin bekannt gewordenen Biotransformationen von Aminopyrin (siehe 3.1.3) verständlich erscheinen.

Insgesamt kann aus diesen Ergebnissen das Verhältnis der in vivo Geschwindigkeitskonstanten von Aminopyrin- und Methylaminoantipyrin-Demethylierung mit 100:33 bis 100:20 abgeschätzt werden. Dagegen steht ein Verhältnis von ca. 100:4.5 bei der Untersuchung der N-Demethylierung an isolierten Rattenhepatozyten [287]. Dies deutet auf einen in vitro qualitativ unterschiedlichen Verlauf hin. Die Hypothese der kompetitiven Hemmung der Biotransformation impliziert, daß die Hemmung in einem abgeschlossenen System (Hepatozyten, rezirkulierend perfundierter Leber) größer ist als in einem offenen System, da in ersterem die hemmenden Produkte nicht ausgeschieden werden können. Untersuchungen von Bast und Noordhoek [298] zeigen für Aminopyrin und MAAP eine kompetitive Konkurrenz um gemeinsame Bindungsstellen. Dies deutet auf eine kompetitive Hemmung der Biotransformation von Aminopyrin auch in isolierten Hepatozyten hin, was die verminderte AAP- Produktion erklärt. Der Effekt kompetitiver Hemmung wird auch in vivo bei Ratte und Meerschweinchen beobachtet (vgl. Abbildung 20 und 23); er führt hier zu Plasmaspiegeln von MAAP, die eine Stunde nach oraler Applikation über dem von AAP liegen, doch ist hier der Effekt wegen der parallel zur Biotranformation ablaufenden Exkretion nicht so drastisch wie in vitro.

Der Weg der Funktionalisierung über Oxidation der 3-ständigen Methylgruppe ist in vivo wie in vitro von untergeordneter Bedeutung. In Hepatozyten der drei untersuchten Spezies entstehen - zumindest bei 100 µmolarer Inkubation - die kürzlich in der Literatur beschriebenen Metaboliten AM-3-CH_2OH und MAAP-3-CH_2-OH [294] in nachweisbaren und zur massenspekrometrischen Strukturaufklärung ausreichenden Mengen. Darüber hinaus werden

noch mindestens zwei weitere Metaboliten (Fraktionen 10 und 11 Abbildung 24) in vivo und in vitro in kleinen Mengen erzeugt, die das für Aminopyrin und seine Biotransformationsprodukte charakteristische UV-Spektrum aufweisen, deren Struktur jedoch massenspektroskopisch nicht geklärt werden konnte. Vermutlich handelt es sich um AM-3-COOH und AAP-3-CH_2-OH (vgl. Abbildung 3). Die Identität der in vivo und in vitro auftretenden Metaboliten wurde durch Übereinstimmung von Retentionszeit und UV-Spektren der einzelnen Komponenten sichergestellt (vgl. Abbildung 24 und Anhang 7.2).

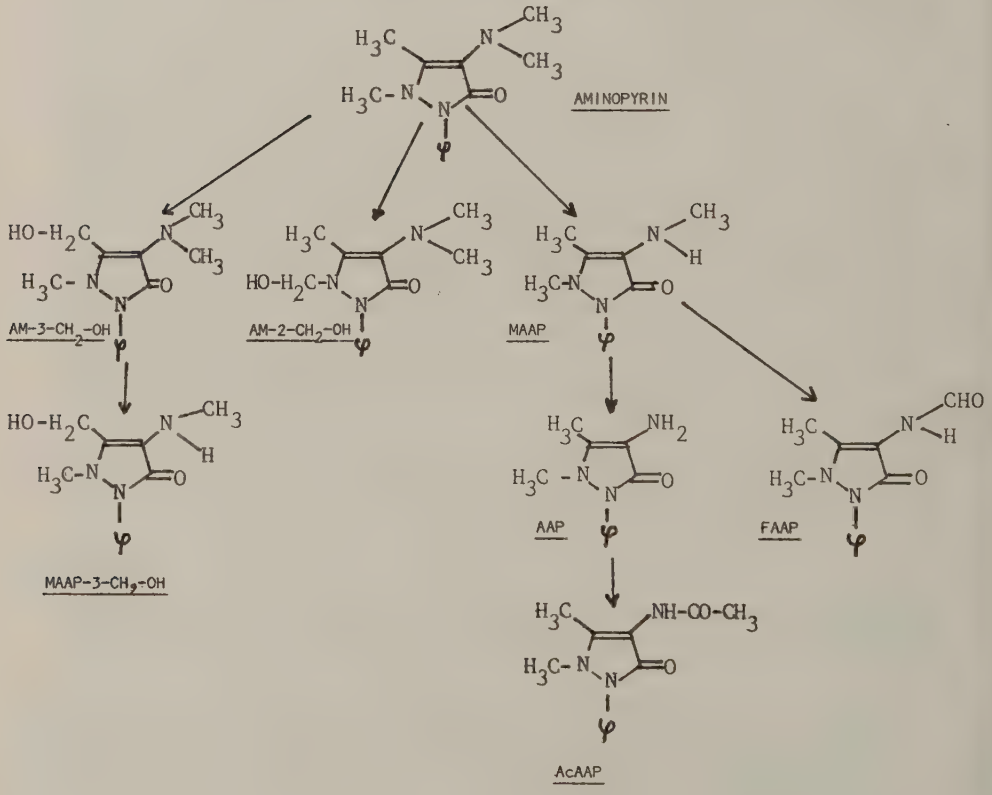
Acetylaminoantipyrin (AcAAP) - der einzige nachgewiesene Phase-II-Metabolit - entsteht in isolierten Hepatozyten der untersuchten Spezies in nur geringfügigen Mengen, die die hohen in vivo Konzentrationen nicht erklären können. Da die für Acetylierungen verantwortliche Acetyl-CoA: Arylamin-N-acetyltransferase innerhalb der Leber überwiegend in den Reticuloendothelzellen lokalisiert ist [362] und weiterhin extrahepatisches Gewebe (z.B. Lunge und Milz) wesentlich zur Acetylierung beitragen kann [362, 363], sind isolierte Leberparenchymzellen für diese Art der Biotransformation kein adäquates Modell.

Das folgende Schema faßt die in vitro und in vivo-Biotransformation bei Ratte, Maus und Meerschweinchen zusammen.

Die so erhaltenen Ergebnisse zur Biotransformation von Aminopyrin an isolierten Hepatozyten unterstützen die Hypothese:

> "Die isolierte Leberparenchymzelle ist die kleinste Einheit, die die in vivo auftretende Vielfalt der Funktionalisierungsreakionen von Fremdsubstanzen als Modellsystem simulieren kann."

SCHEMA 2: ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOTRANSFORMATION VON AMINOPYRIN BEI RATTE, MAUS UND MEERSCHWEINCHEN. ZUSÄTZLICH ZU DEN DARGESTELLTEN METABOLITEN ENTSTEHEN NOCH MINDESTENS ZWEI WEITERE BIOTRANSFORMATIONSPRODUKTE UNBEKANNTER STRUKTUR. (φ = PHENYL)



5.2 Effekt der Serumalbuminbindung auf die Biotransformation von Lonazolac in isolierten Hepatozyten und rezirkulierend perfundierter Leber der Ratte

Die Biotransformation wird wie Bioverfügbarkeit und Exkretion in vivo durch die Bindung an Serumproteine - hauptsächlich Serumalbumin - beeinflußt, da die hydrophilen Protein-Pharmakon-Komplexe keine biologischen Membranen passieren können. Der sogenannte "first-pass-effect" bei dem die Fremdsubstanz überwiegend in der ersten Leberpassage durch Biotransformation inaktiviert wird, kann so wirkungsvoll verhindert und damit die effektive Wirkzeit erhöht werden.

Lonazolac bindet stark an Serumalbumin (96.8% bei Albumin: Substanz = 10:1). Diese Bindung ist unspezifisch und reversibel. Wie die Wiederauffindungsraten von Lonazolac und des in der Diplomarbeit beschriebenen Metaboliten M I aus Humanserum (95.1 $\pm$ 4.9 bzw. 98.6 $\pm$ 4.3, n = jeweils 5) im Konzentrationsbereich von 0.5 bis 10 mg/l zeigen, ist die Bindungsaffinität des Vorsäulenmaterials für diese Verbindungen wesentlich grösser als die der Serumproteine, was die Anwendung der Vorsäulentechnik auf vergleichende Untersuchungen von Inkubations- bzw. Perfusionsmedien mit und ohne Albuminzusatz ermöglicht.

Die Gegenüberstellung der Biotransformationskinetiken von Lonazolac durch isolierte Rattenhepatozyten mit und ohne Albuminzusatz (Abbildung 35) zeigt, daß isolierte Hepatozyten aufgrund ihrer intakten Plasmamembran den Effekt der Serumalbuminbindung auf die Biotransformation untersuchen lassen. Weitere Untersuchungen zeigen, daß Lonazolac in mit Albumin inkubierten, isolierten Hepatozyten nach 30 min noch zu 83.3 $\pm$ 10.6% (n = 4) unverändert vorliegt, während es bei Inkubationen ohne Albumin zum gleichen Zeitpunkt bereits quantitativ zu M I umgesetzt wurde.

Im Gegensatz zur Kinetik in isolierten Hepatozyten verläuft die Biotransformation von Lonazolac in der rezirkulierend perfundierten Rattenleber ohne Albuminzusatz wesentlich langsamer. Außerdem liegen die Konzentrationen von Lonazolac und seinem Metaboliten sowohl im Perfusat wie auch in der abgeleiteten Galle deutlich unter denen der Vergleichsexperimente mit Albumin, bei denen auch die Halbwertszeit von Lonazolac nicht wesentlich verlängert ist. Dies legt die Vermutung nahe, daß der Hauptanteil von Lonazolac bei Perfusion ohne Albumin unspezifisch in der Leber - z.B. in den Retikuloendothelzellen - adsorbiert wird, was niedrige Lonazolackonzentrationen vortäuscht und dadurch die tatsächlichen Metabolisierungsraten bei Abwesenheit von Albumin verfälscht. Diese Vermutung kann jedoch aufgrund der vorliegenden Experimente nicht eindeutig belegt werden.

5.3 Biotransformation von Benzaron in der Ratte

Die Aufklärung der Biotransformationsprodukte aus Rattengalle durch HPLC-Metabolitenfraktionierung und Massenspektrometrie führte durch cochromatographierende UV-inaktive endogene Komponenten (u.a. Palmitinsäure) zu nicht eindeutig interpretierbaren Massenspektren. Hochauflösungsmessungen an diesen Proben konnten jedoch die Existenz von einfach hydroxylierten Benzaronmetaboliten bestätigen.

Isolierte Hepatozyten in Kombination mit der HPLC-Vorsäulentechnik machen auch hier Metabolitenstrukturen weitgehend zugänglich: Zwei Cumaron-hydroxylierte und ein Phenyl-hydroxylierter Metabolit können sicher nachgewiesen werden, und einige Indizien sind für einen bis-hydroxylierten Metaboliten vorhanden. Die genaue Lokalisierung der Hydroxylgruppen gelingt jedoch mit der Massenspektrometrie nicht, und aussagefähigere Methoden wie die Kernresonanzspektroskopie sind bei den geringen isolierten Metabolitenmengen nicht anwendbar.

Die aus Rattenhepatozyteninkubationen isolierten Metaboliten sind aufgrund ihrer chromatographischen Charakteristika mit denen der in vivo isolierten Rattengalle identisch.

5.4 Biotransformation N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidine durch Rattenhepatozyten

Die Biotransformationsuntersuchungen an N-alkylsubstituierten 4,4-Diphenylpiperidinen wurden durchgeführt, um die Ursachen für das unterschiedliche pharmakodynamische Verhalten dieser Verbindungen zu klären.

Die Metabolisierung der untersuchten Diphenylpiperidine verläuft in Abhängigkeit von der Struktur des N-ständigen Alkylrestes.

Bei kleinen Resten (C_1 bis C_3) führt rasche N-Dealkylierung ausschließlich zum freien 4,4-Diphenylpiperidin. Bei größeren Resten (C_4 bis C_6) trten andere Biotransformationsreaktionen in den Vordergund: Die verschiedenen in 3.1.3 dargestellten N-Dealkylierungsmechanismen setzen die Verfügbarkeit mindestens eines Protons am N- -ständigen C-Atom voraus. t-Butyl-4,4-diphenylpiperidin (Budipin) kann also auf diesem Wege nicht N-dealkyliert werden. Dies führt zur wesentlich langsamer ablaufenden Arylhydroxylierung als Funktionalisierungsreaktion (vgl. Abbildungen 43-46). Im Gegensatz zu Budipin wird N-t-Pentyl-4,4-diphenylpiperidin wesentlich rascher umgesetzt, wobei die N-Dealkylierung nur von untergeordneter Bedeutung ist. Da die 4,4-Diphenylpiperidine nur schwach an Albumin gebunden werden (32.6% für Budipin bei Albumin: Substanz = 10:1) und kein signifikanter Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit bei Inkubationen mit und ohne Albumin auftritt, ist, außer bei Budipin, mit rascher Biotransformation in der ersten Leberpassage zu rechnen. Der Einsatz der t-Butylgruppe als Dealkylie-

rungsschutz wurde auch bei Butoxamin beschrieben [365], allerdings steht dabei nicht die Wirkungsverlängerung im Vordergrund, sondern die Umgehung des Nebenwirkungen verursachenden Metaboliten Methoxamin.

Das überlegene pharmakodynamische Verhalten von Budipin kann somit durch die Untersuchungen an isolierten Hepatozyten auf die selektive Blockierung der N-Dealkylierung zurückgeführt werden.

5.5 Anwendungsmöglichkeiten und -grenzen isolierter Hepatozyten bei Biotransformationsuntersuchungen

Wie aus den Abbildungen 43 - 46 ersichtlich ist, kann sich die substituentenabhängige Reihenfolge der N-Dealkylierungsgeschwindigkeiten innerhalb einer Parallelinkubation in einzelnen Fällen vertauschen.

Dies weist auf eine hohe Variabilität innerhalb einer Parallelinkubation hin. Die Untersuchung der Streuweite einer Inkubation mit i-Propyl-4,4-diphenylpiperidin (Prodipin, 100 µmolar) in 10 parallelen Ansätzen mit Zellen einer Präparation führt zu einer Varianz von 24.2%. Diese Streuweite ermöglicht zwar nicht die Zuordnung einer exakten Struktur zur Kinetik, doch können große quantitative Metabolisierungsunterschiede (z.B. Prodipin /Budipin) und qualitative Veränderungen, d.h. das Auftreten verschiedener Metaboliten, leicht ausgemacht werden.

Die Fähigkeiten isolierter Hepatozyten als Modellsystem für die in vivo-Biotransformation liegen vor allem in der Möglichkeit, Metabolitenstrukturen leicht zugänglich zu machen und somit Biotransformationsmuster zu erstellen. Darüber hinaus ist mit diesem Modell die Untersuchung des Einflusses der

Serumalbuminbindung auf die Biotransformation - und damit die Abschätzung des 'first pass' Effektes - wesentlich leichter möglich, als mit dem Modellsystem der rezirkulierend perfundierten Leber. Qualitative und/oder große quantitative Unterschiede in der Biotransformation homologer Verbindungen sind mit isolierten Hepatozyten, bei Anwendung leistungsfähiger analytischer Methoden leicht feststellbar. Dies ermöglicht den Einsatz des Modells, mit der Kopplung an pharmakodynamische Untersuchungen, zur Optimierung der pharmakologischen Wirkung von Arzneimitteln.

Die Interpretation von kinetischen Daten aus Hepatozytenexperrimenten wird durch das unterschiedliche Ausmaß kompetitiver Effekte gegenüber in vivo-Verhältnissen und durch hohe Varianz innerhalb der Versuchsreihen erschwert. Dies mindert die Aussagefähigkeit des Modells bei kinetischen Untersuchungen.

6. EXPERIMENTELLES

6.1 Chemikalien, Tiere, Inkubationsmedien, chromatographische Eluenten

Die Salze für Zellpräparationen und Chromatographie waren von höchstem kommerziell erhältlichem Reinheitsgrad (Merck, Darmstadt). Für die Zellpräparation wurde bidestilliertes, für die Chromatographie tridestilliertes Wasser verwendet.

Die untersuchten Substanzen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

Lonazolac und N-alkylsubstituierte 4,4-Diphenylpiperidine
von Byk Gulden Lomberg, Chem. Fabrik GmbH, Konstanz

Aminopyrin und seine Metaboliten MAAP, AAP, AcAAP und FAAP (siehe Abbildung 3)
von der Hoechst AG, Frankfurt-Hoechst

Benzaron und 3'-Hydroxybenzaron
von Sanol Schwarz, Monheim

Bufuralol wurde freundlicherweise von Prof. Dr. U.A. Meyer überlassen.

Sprague-Dawley-(SD)-Ratten vom Stamm SIV-50, Albinomeerschweinchen und N.M.R.I.-Mäuse von 200 g, 250 g bzw. 20 g mittleren Gewichts wurden von der Fa. Ivanovas (Kißlegg) bezogen.

Zellpräparationen: Kollagenase, Typ "Worthington" (Seromed, München); Rinderserumalbumin, "Fraction V" (Sigma, St. Louis, USA); Glukose "für biochemische Zwecke" (Merck, Darmstadt).
BS-Medium: 118 mmol NaCl; 2.5 mmol Na_2HPO_4; 2.0 mmol $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$; 6.0 mmol KCl; 20.0 mmol $NaHCO_3$; 5.0 mmol Glukose.

Perfusionsmedium: BS-Medium mit 0.05 Gew.% Kollagenase;
Zellaufarbeitungsmedium: BS-Medium mit 0.5% fettfreiem Rinderserumalbumin;
Inkubationsmedium: BS-Medium mit 0.5% Rinderserumalbumin und 1.4 mmol $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$.

Chromatographische Eluenten

Die einzelnen chromatographischen Eluenten sind mit weiteren Parametern bei den einzelnen Abbildungen angegeben. Wenn nicht anders angegeben, entstehen die Mischungen mit Acetonitril (LiChrosorb, Merck, Darmstadt) durch Zusammenfügen einzelner abgemessener Volumina (v+v). Bei der Angabe v:v wird der zuerst genannte Eluent vorgelegt und mit Acetonitril bis zur Meßmarke aufgefüllt. Vor Gebrauch werden die mit tridestilliertem Wasser hergestellten Eluenten 5 min am Wasserstrahlvakuum unter Rühren entgast.

Glukose und Proteinbestimmung

Glukose- und Proteinbestimmung erfolgten nach der Gluc-DH-Methode (Merck) [366, 367] bei 340 nm bzw. mit der Binret-Methode (nach Boehringer Precimat Test) bei 540 nm.

6.2 Geräte

6.2.1 Zellpräparation

Schlauchquetschpumpe (Rumo 100, Heidolph, Kehlheim); Oxygenator und Perfusionskammer (Eigenkonstruktion); thermostatisierbares Schüttelbad (Köttermann, Hänigsen); Zentrifuge (Eppendorff Gerätebau, Hamburg); Mikroskop (Diavert, Leitz, Wetzlar).

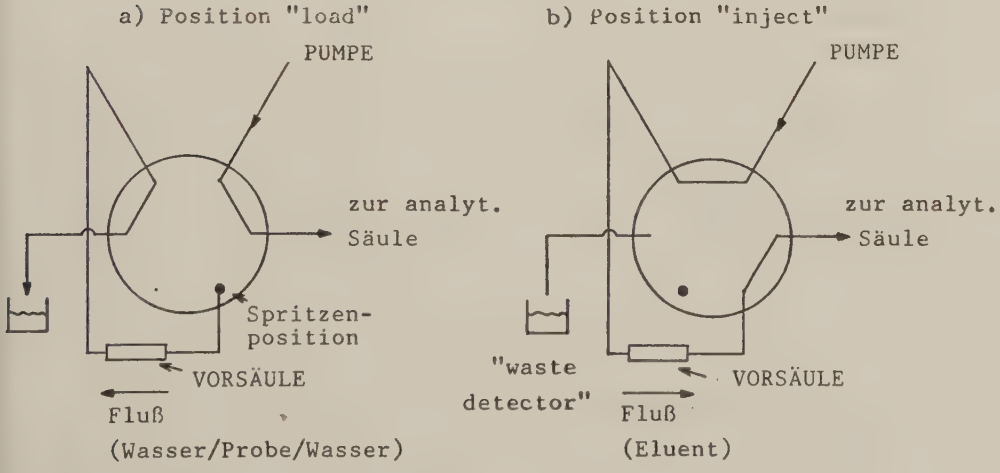
Glukose- und Proteinbestimmung: automatisches Spektralphotometer Modell 7400 (LKB-Instruments, Gräfelfing); Zellzählung: Coulter Channelyzer (Coulter Electronics, Harpenden, GB).

6.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Chromatographen: Modell 1010B und Modell 1084B (Hewlett Packard, Böblingen); Gradientenformer M 2500 und Konstantflußpumpe M 600/200 (Gynkotek, München);
Injektion: HPLC-Probenschleifeneinspritzventile 7125 (Rheodyne, Berkeley, CA, USA); automatischer Probenaufgeber des Chromatographen 1084B;
Säulen und Trennmaterialien: HPLC-Säulen werden, wie in den Abbildungen angegeben, von folgenden Herstellern erhalten: Bischoff-Analysentechnik, Leonberg; Merck, Darmstadt; Dr. Knauer, West-Berlin. Die analytischen Säulen waren mit dem jeweils in den Abbildungen angegebenen Füllmaterial mit 5 µm Partikelgröße gepackt. Als Füllmaterial für die Vorsäulen wurden LiChrosorb RP-18 (25-40 µm, Merck, Darmstadt) und Nucleosil 30-C_{18} (Machery & Nagel, Düren) verwendet. Die Vorsäulen wurden trocken gefüllt.
Detektoren: Folgende UV-Detektoren mit variabler Wellenlängeneinstellung kamen zum Einsatz: Spectro Monitor II (Laboratory Data Control Division, Hasselroth); HP 1030B und HP 1040 A mit Rechner HP 85; Diskette HP 82901M und XY-Plotter HP 7470 A (Hewlett Packard, Böblingen); LC-75 (Perkin Elmer, Überlingen).
Detektionswellenlängen:

Aminopyrin und Metaboliten:	257 bzw. 260 nm
Lonazolac und Metabolit:	282 nm
4,4-Diphenylpiperidine:	220 nm
Naftidafuryl:	222 nm
Bufuralol:	275 nm

HPLC-Vorsäulentechnik zur direkten Analyse von Fremdsubstanzen und ihrer Metaboliten aus biologischen Flüssigkeiten: Die trokken mit grobkörnigem "reversed phase" Material gefüllte Vorsäule wird manuell mit Hilfe einer Spritze aufsteigend so lange mit Acetonitril gespült, bis keine Luftblasen mehr austreten. Anschließend wird mit Wasser gespült, um das Ausfallen der Puffersubstanzen zu verhindern. Die so konditionierte Vorsäule wird statt der Probenschleife ins Injektionsventil eingebaut (Schema 3) und ist damit betriebsfertig. Die Proben werden je nach Analysenproblem in den bei 4.2.1 beschriebenen Volumina mit adäquaten Spritzen aufgetragen, angereichert und gereinigt. Zur Kontrolle des Vorgangs werden Proteine durch Präzipitation in 50%igem Acetonitril detektiert ("waste-detector"). Das Spülvolumen wird mindestens doppelt so groß gewählt wie dasjenige, bei dem keine Präzipitation mehr feststellbar ist. Anschließend wird die Probe mit dem chromatographischen Eluenten auf die analytische Säule rückgespült.



Schema 3: Flußdiagramm der HPLC-Vorsäulentechnik

Metabolitenfraktionierung und Aufarbeitung für die Massenspektrometrie: Die Abbildung 24a entsprechenden Aminopyrin-Metabolitenfraktionen werden aus einer chromatographischen Trennung nach Vorsäulenanreicherung von 1 ml Überstand einer 100 µmolaren Aminopyrininkubation in 1.5 ml Injektionsfläschchen fraktioniert, die zuvor mit $NaOH/H_2O_2$, tridestilliertem Wasser und Acetonitril (LiChrosolv, Merck, Darmstadt) gereinigt wurden. Das Acetonitril der Fraktionen wird mit Stickstoff weitgehend abgeblasen und die Identität durch Rechromatographieren von 50 µl/Fraktion überprüft. Alle Fraktionen weisen die für sie charakteristische Retentionszeit auf. Bis auf Fraktion 11, deren Peak eine leichte Schulter aufweist, chromatographieren alle Fraktionen einheitlich.

In jedes Injektionsfläschchen werden zur gesammelten Fraktion 500 µl Dichlormethan/2-Propanol (9:1) gegeben und die verschlossenen Fläschchen bei 450 min^{-1} aufrecht geschüttelt. Die Oberphase wird mit einer Spritze vollständig entfernt und der verbleibende Extrakt unter leichtem Stickstoffstrom bis zur Trockene abgeblasen.

Bis zur Massenspektrometrie werden die Proben verschlossen im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt. Zur Aufnahme der Massenspektren werden zu jeder Fraktion 20 µl Dichlormethan gegeben, von denen 10 µl mit einer Spritze in das Quarztiegelchen des Massenspektrometers überführt und bei Raumtemperatur eingedampft werden.

6.2.3 Gaschromatographie

Die gaschromatographischen Analysen werden mit einem Fractorap 2501 (Carlo Erba, Milano) Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor bei den in 4.1.1 genannten Bedingungen durchgeführt.

6.2.4 Integration und Datenverarbeitung

Die Chromatogramme werden durch einen Integrator HP 3380A (Hewlett-Packard, Böblingen) und/oder durch ein HP-LAS 3354 B/C Labordatensystem (Hewlett-Packard, Böblingen) integriert, mit dem auch sämtliche anderen in dieser Arbeit verwendeten Daten verarbeitet werden.

6.2.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektren werden im Direkteinlaß mit einem VG Micromass MM 7070F Massenspektrometer mit Datensystem (Vacuum Generators, Manchester), aufgenommen.

6.3 Präparation von Hepatozytensuspensionen von Ratte, Maus und Meerschweinchen

Die Hepatozytenpräparation ist eine Weiterentwicklung der Methode von Berry und Friend [198] und erfolgt durch rezirkulierende Kollagenaseperfusion der isolierten Leber (20 min, ca. 20 ml/min Perfusionspuffer, 37°C). Das Perfusionsmedium wird durch einen Dünnfilmoxygenator mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2, Messer, Griesheim) begast und durchläuft das Kapillarnetz der Leber nach Kanülieren der Pfortader und Öffnen der Vena cava inf.. Am Ende der Perfusion wird der Perfusionspuffer durch 50 ml frisches BS-Medium ersetzt, die Leber vorsichtig aufgeschnitten und die Zellen durch leichtes Schütteln in 100 ml Zellaufarbeitungsmedium (4°C) suspendiert. Anschließend wird unter Carbogenbegasung bei 37°C 10 min mit ca. 4 Hz geschüttelt, durch Nylongaze (75 µm) filtriert und 15 min auf Eis gestellt. Der Überstand wird abgesaugt und die verbleibende

Suspension mit Inkubationsmedium auf 60 ml aufgefüllt. Zu je 3 ml dieser Stammsuspension werden in 50 ml Erlenmeyerkölbchen 10.5 bzw. 12 ml Inkubationsmedium gegeben und 15 min im Schüttelbad bei 37°C unter Carbogenbegasung vorinkubiert. In dieser Suspension werden die Zellen mit dem Coulter Channelyzer (siehe 7.1) gezählt. Die zu untersuchenden Substanzen werden dann in 1.5 bzw. 0.15 ml wäßriger Lösung zum Inkubationsansatz gegeben. Die Probenentnahme erfolgt vor und direkt nach Substanzzugabe (Leer- bzw. Nullwert) und zu den in den Abbildungen angegebenen Zeitpunkten. Nach jeder Probenentnahme wird eine Minute mit Carbogen begast. Zur Probenentnahme werden 1.2 ml Suspension entnommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Die Vitalität der Präparation wird nach der Entnahme des 30-Minuten-Wertes durch Trypanblauausschluß (0.5% Trypanblau in physiologischer Kochsalzlösung/Zellsuspension, 9:1) mikroskopisch überprüft. Präparationen mit weniger als 75% intakten Zellen werden verworfen.

6.4 Festlegung der Inkubationskonzentrationen mittels Glukoneogenese

Bei den Inkubationskonzentrationen muß ein Kompromiß zwischen den analytisch meßbaren und den für die Zellen schädlichen gemacht werden. Dazu wird der Einfluß der zu untersuchenden Verbindungen auf die glukoneogenetische Kapazität der Zellen bei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Da die Glukoneogenese aus Zwischenprodukten des Tricarbonsäurezyklus mit Biotransformationsprozessen interagiert (siehe 3.1.3) und andererseits die Funktionsfähigkeit zytosolischer und membranständiger Enzyme sowie von intrazellulären Transportprozessen voraussetzt [368], wird der Einfluß auf die glukoneogenetische Kapazität in Parallelinkubationen an Rattenhepatozyten als Maß

für die Belastung der Zellen herangezogen. Bei den eingesetzten Konzentrationen wird die Glukoneogenese aus Laktat/Pyruvat (10 mmol + 1 mmol) nach 60 min um nicht wesentlich mehr als 20% bei 100 µmol Fremdsubstanz verringert; daher wurde diese Konzentration für die überwiegende Anzahl von Experimenten gewählt. Die Abbildungen 48 und 49 zeigen beispielhaft den Einfluß von Aminopyrin bzw. N-alkylsubstituierter 4,4-Diphenylpiperidinen auf die Glukoneogenese in Rattenhepatozyten.

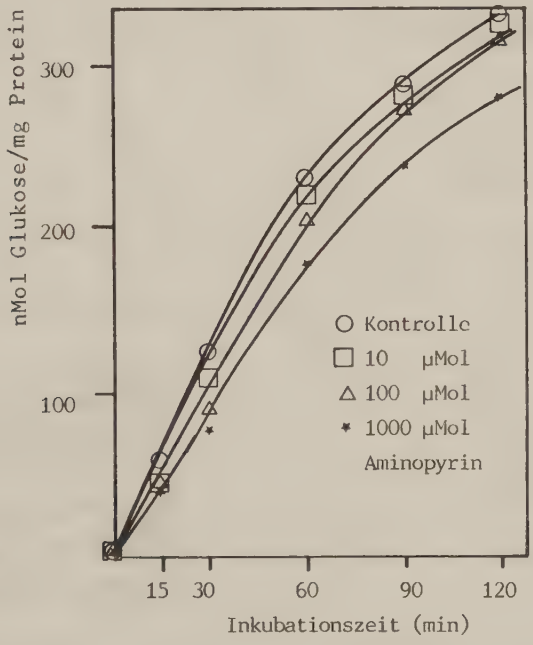


Abbildung 48: Beeinflussung der Glukoneogenese in Hepatozyten einer männlichen SD-SIV-50-Ratte (200 g, 18 Stunden nüchtern) durch unterschiedliche Aminopyrinkonzentrationen.

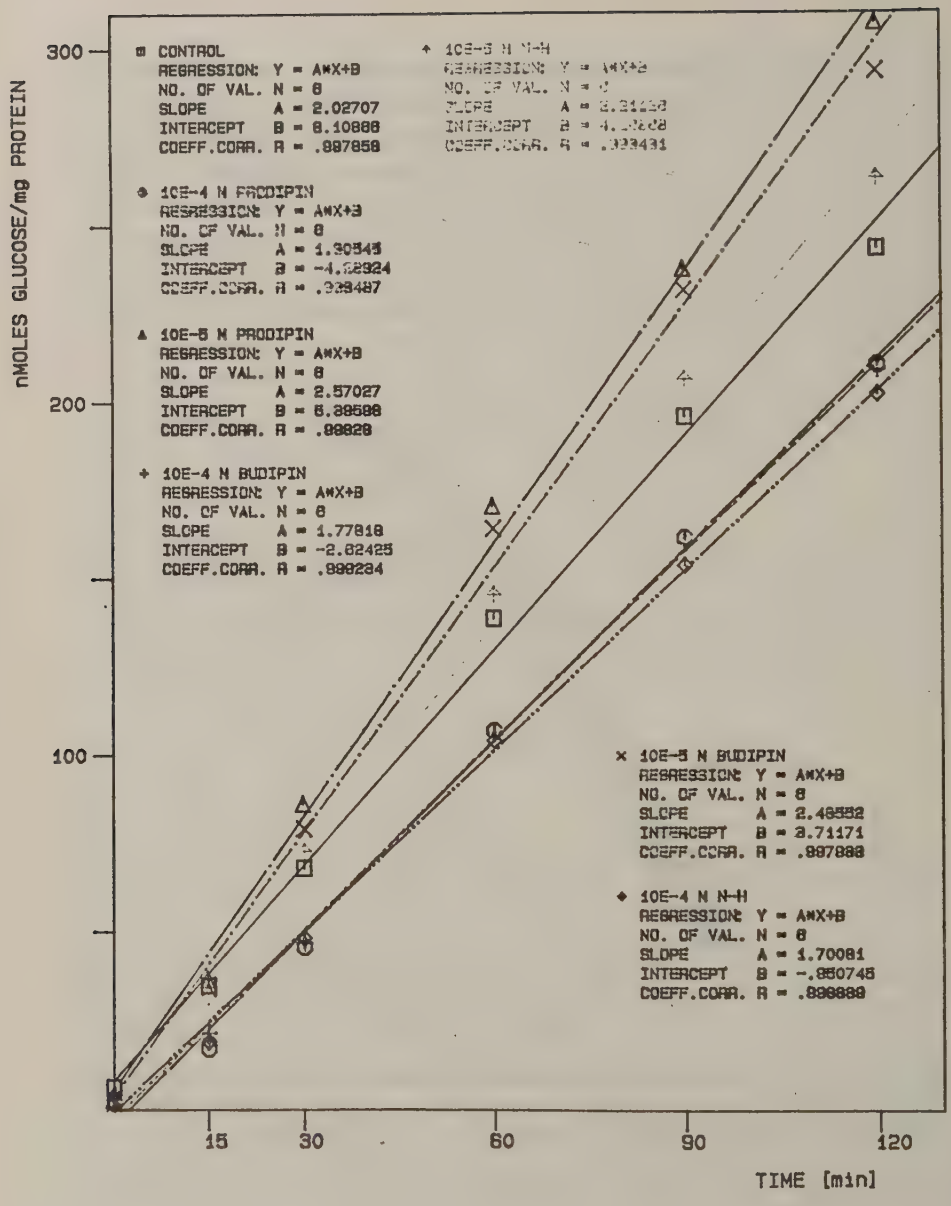


Abbildung 49: Einfluß von Prodipin, Budipin und 4,4-Diphenylpiperidin auf die Glukoneogenese in Rattenhepatozyten (männliche SD-SIV-50-Ratte, 200 g, 18 Stunden nüchtern).

7. ANHANG

Neben der typischen Größenverteilung isolierter Hepatozyten werden im Anhang Chromatogramme und UV-Spektren von Aminopyrin und seinen Metaboliten vorgestellt.

Neben Spektren und Absorptionsverhältnissen von Referenzsubstanzen finden sich hier die, der für die Massenspektrometrie isolierte Metabolitenfraktionen, deren Einheitlichkeit durch Vergleich der Spektren an den Wendepunkten (gekennzeichnet als "up" bzw. "down") an der Spitze (gekennzeichnet als "apex") der Peaks gezeigt wird.

7.1 Typische Größenverteilung isolierter Rattenhepatozyten

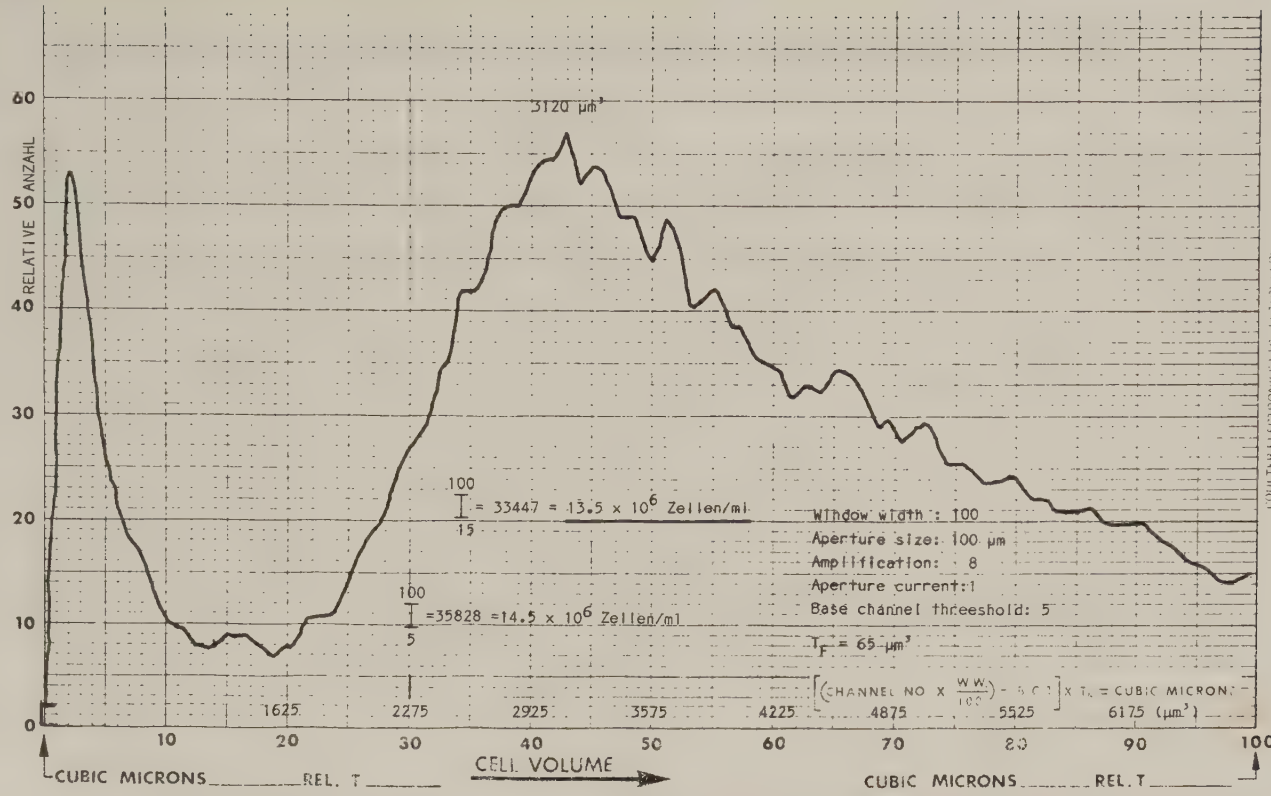
7.2 UV-Spektren und Chromatogramme

Seite

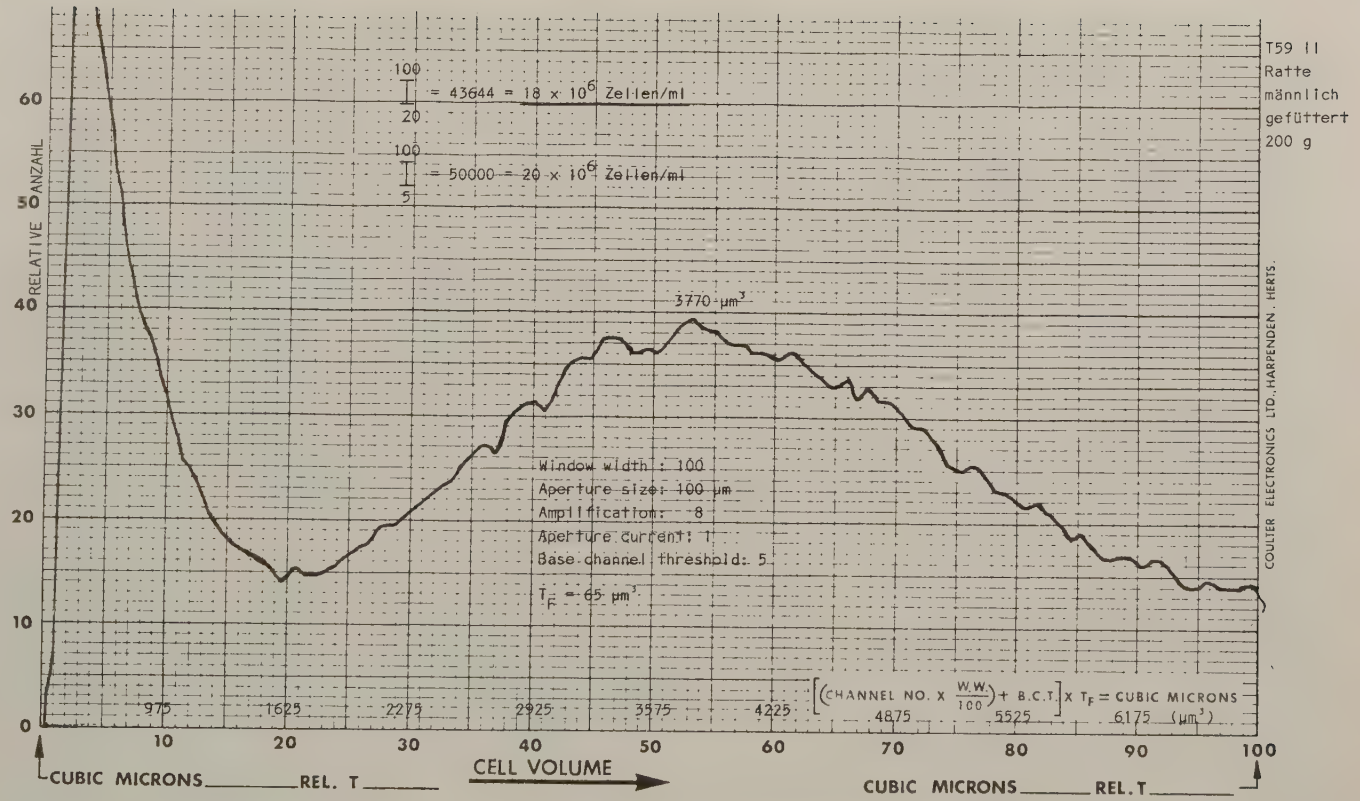
Molare Extinktionskoeffizienten von Aminopyrin bei verschiedenen pH-Werten 105
Molare Extinktionskoeffizienten von 4-Aminoantipyrin bei verschiedenen pH-Werten 105
UV-Spektren von 4-Aminoantipyrin bei verschiedenen pH-Werten 106

Referenzspektren der Aminopyrin-Metaboliten in wäßriger Lösung
Aminopyrin 107
Methylaminoantipyrin 108
Aminoantipyrin 109
Acetylaminoantipyrin 110
Formylaminoantipyrin 111

Normierte Referenzspektren von Aminopyrin-Metaboliten im chromatographischen System 112
Formyl- und Acetylaminoantipyrin 113
HPL-Chromatogramm der Trennung von Aminopyrin-Metaboliten aus Rattenhepatozyten bei 230 und 260 nm 114
Normierte Spektren von Aminopyrin-Metaboliten und anderen Komponenten aus Rattenhepatozyteninkubationen
FR. 9, 11, 12 115
FR. 15, 16, 17, 18 116
Einheitlichkeit der Metabolitenfraktionen aus Rattenhepatozyten
FR. 2 117
FR. 7 118
FR. 8 119
FR. 9 120
FR. 11 121
FR. 12 122
FR. 13 123
FR. 14 124
FR. 15 125
FR. 16 126
FR. 17 127
FR. 18 128
HPL-Chromatogramm der Trennung von Aminopyrin-Metaboliten aus Rattenplasma bei 210 und 260 nm 129
UV-Spektren stark polarer Komponenten aus Rattenplasma 130
UV-Apektren mittelpolarer Komponenten aus Rattenplasma, Vergleich mit Methylaminoantipyrin 133
UV-Spektren von Aminoantipyrin und Formyl- und Acetylaminoantipyrin aus Rattenplasma und Standardlösung 134
UV-Spektren von Methylaminoantipyrin und Aminopyrin aus Rattenplasma und Standardlösung 135



Typische Größenverteilung der isolierten Hepatozyten einer männlichen, nüchternen Ratte (200g).



Typische Größenverteilung der isolierten Hepatozyten einer männlichen, gefütterten Ratte (200g).

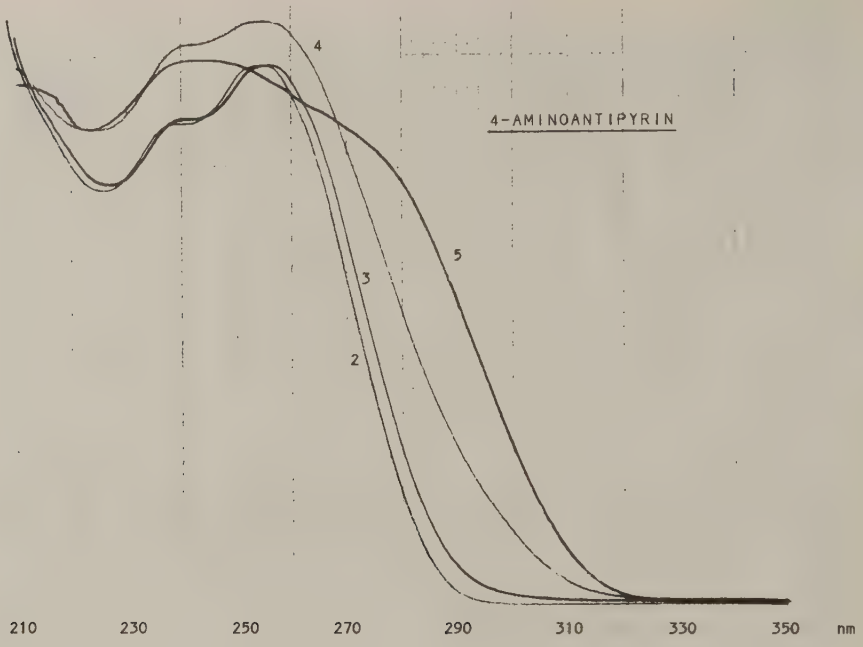
Molare Extinktionskoeffizienten von Aminopyrin bei verschiedenen pH-Werten (1.058×10^{-4} molar) in 10% Methanol/Wasser.

pH	max	
13.0	265	8.25×10^3
5.21	258	8.48×10^3
4.21	275	8.87×10^3
3.16	257	9.01×10^3
2.17	257	9.17×10^3

Molare Extinktionskoeffizienten von 4-Aminoantipyrin bei verschiedenen pH-Werten (2.84×10^{-4} molar) in Wasser.

pH	max		max	
8.0	270	8.31×10^3	244	9.35×10^3
7.0	270	8.33×10^3	244	9.35×10^3
6.0	270	8.26×10^3	244	9.28×10^3
5.0	-	——	244	9.00×10^3
4.0	256	8.91×10^3	244	8.47×10^3
3.0	258	9.02×10^3	244	8.03×10^3
2.0	258	9.02×10^3	244	7.94×10^3

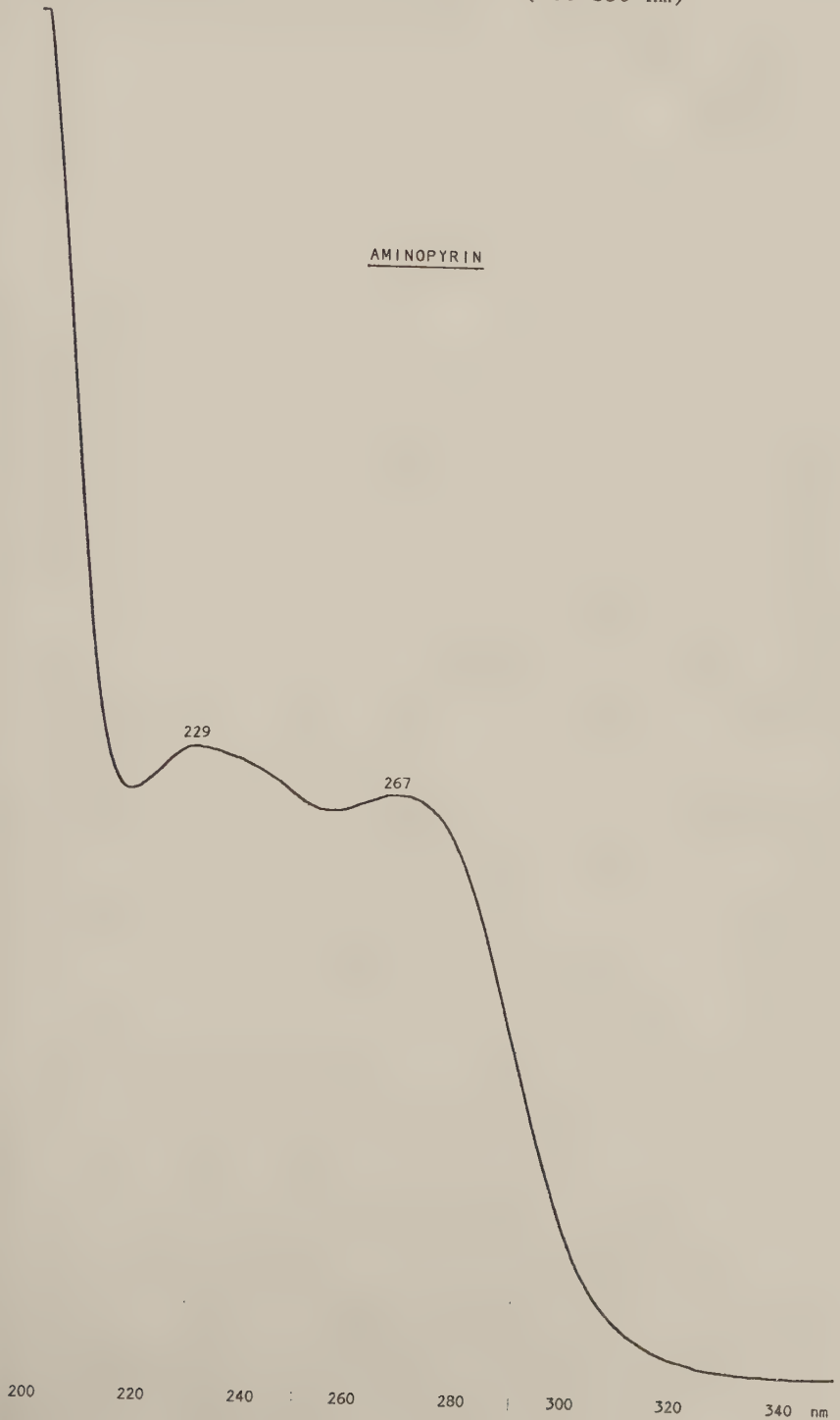
pH-Abhängigkeit der UV-Absorption von 4-Aminoantipyrin



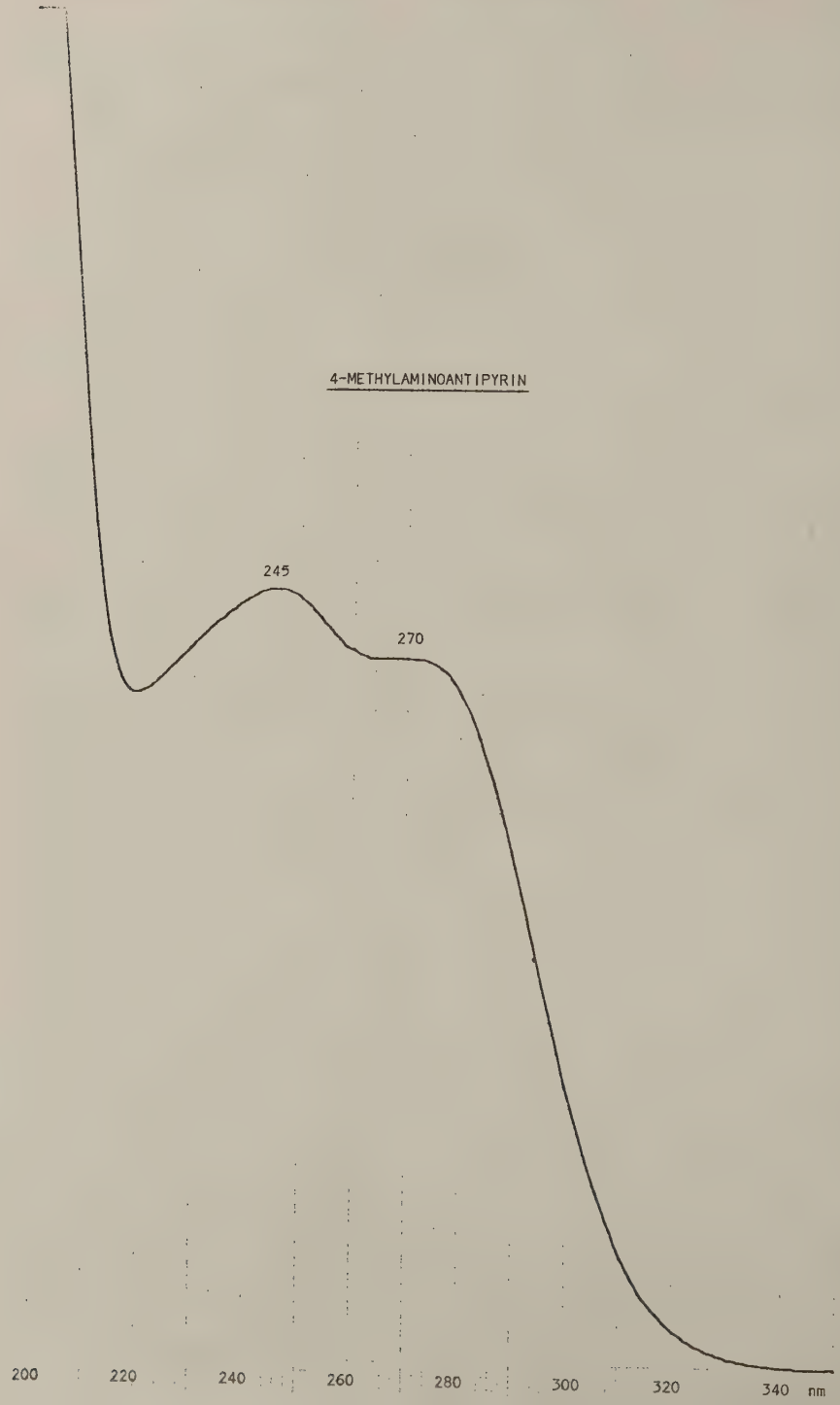
Konzentration: 2.767×10^{-3} M in Wasser

2 = pH2; 3 = pH3; 4 = pH4; 5 = pH5

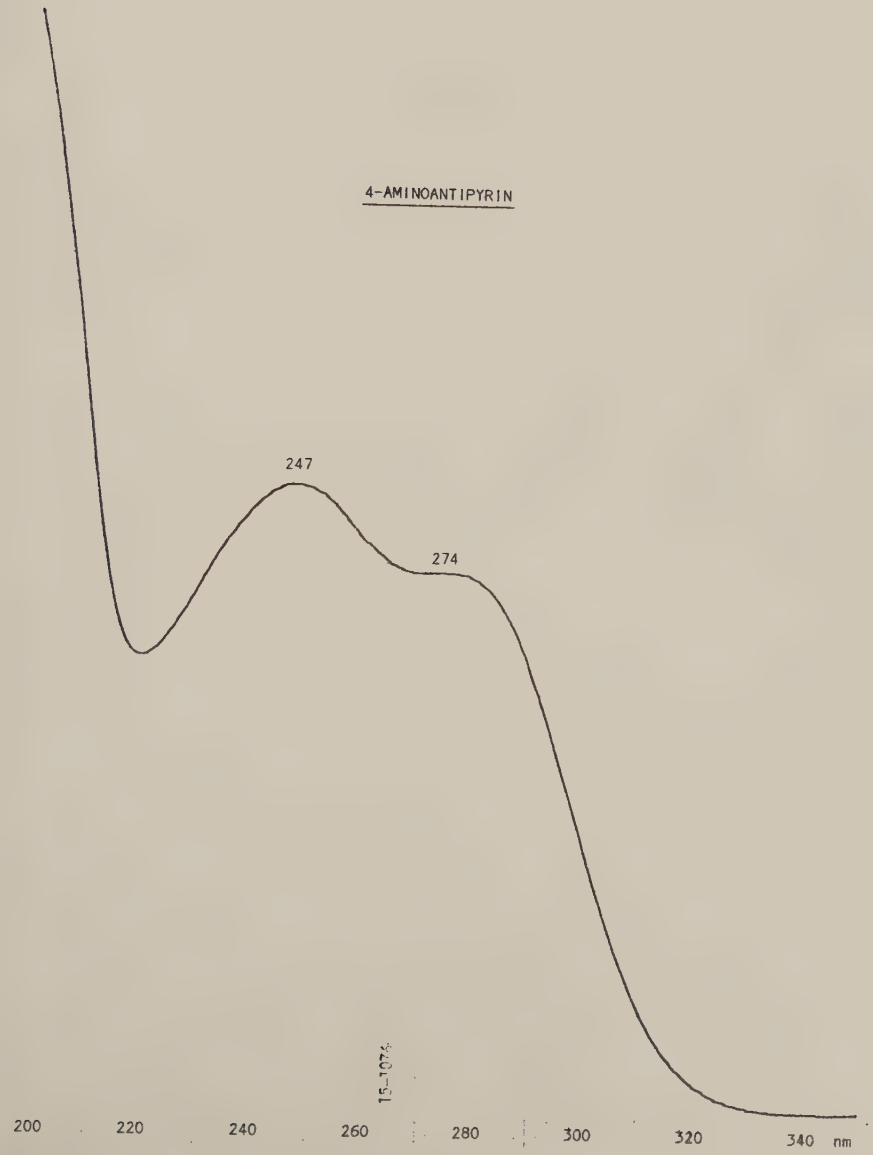
UV-Spektrum von Aminopyrin in Wasser (200-350 nm)



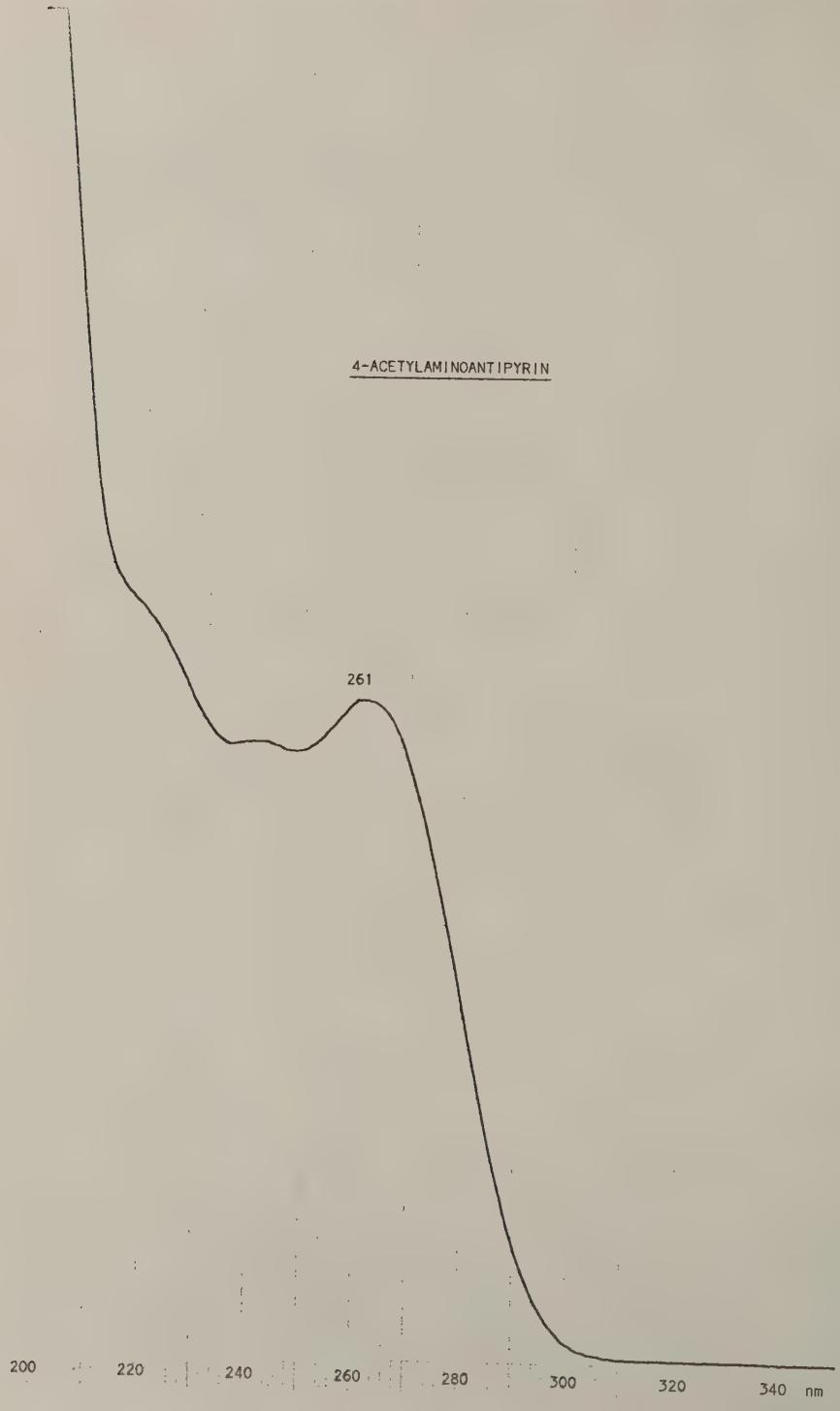
UV-Spektrum von 4-Methylaminoantipyrin (MAAP) in Wasser



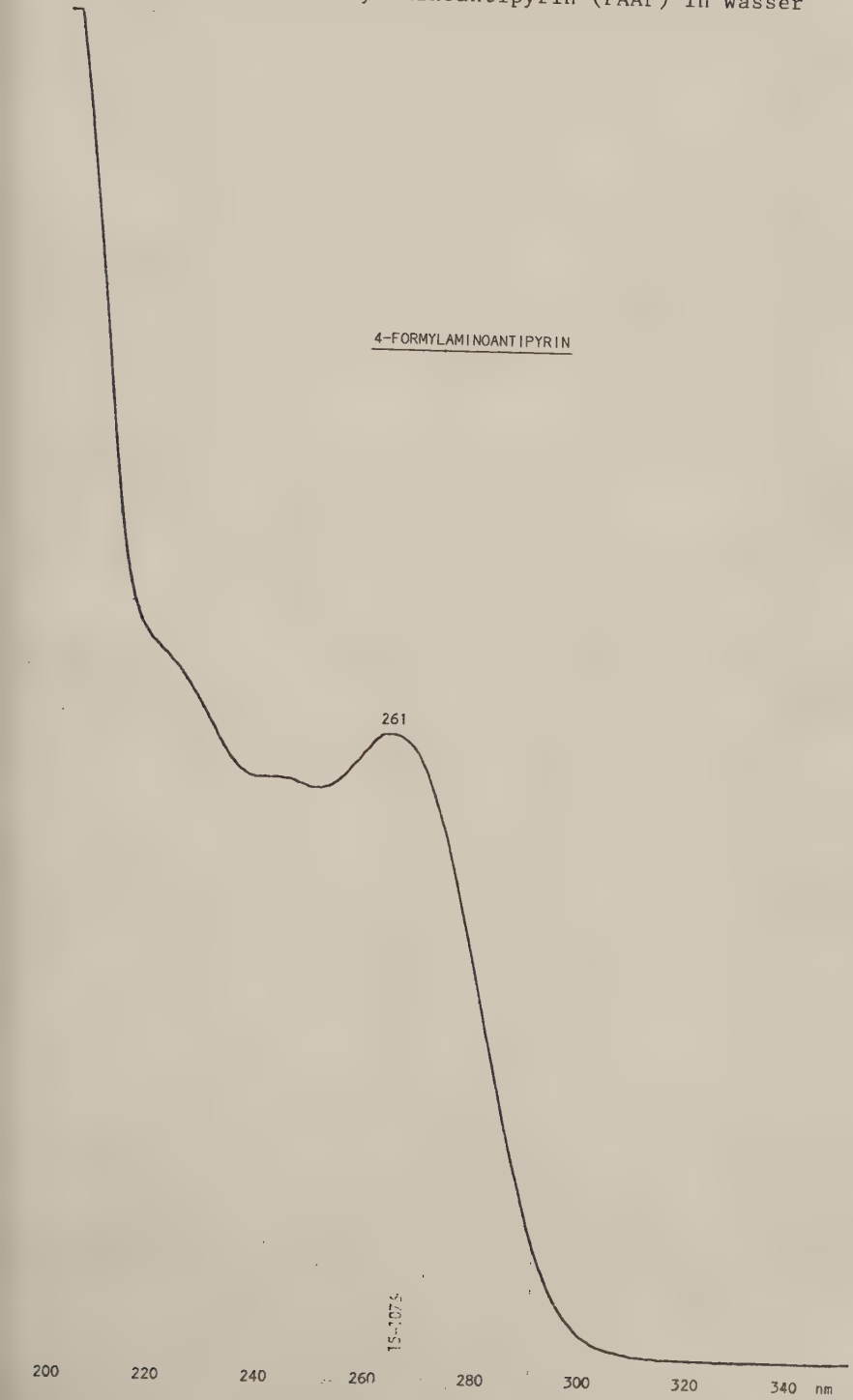
UV-Spektrum von 4-Aminoantipyrin (AAP) in Wasser



UV-Spektrum von 4-Acetylaminoantipyrin (AcAAP) in Wasser

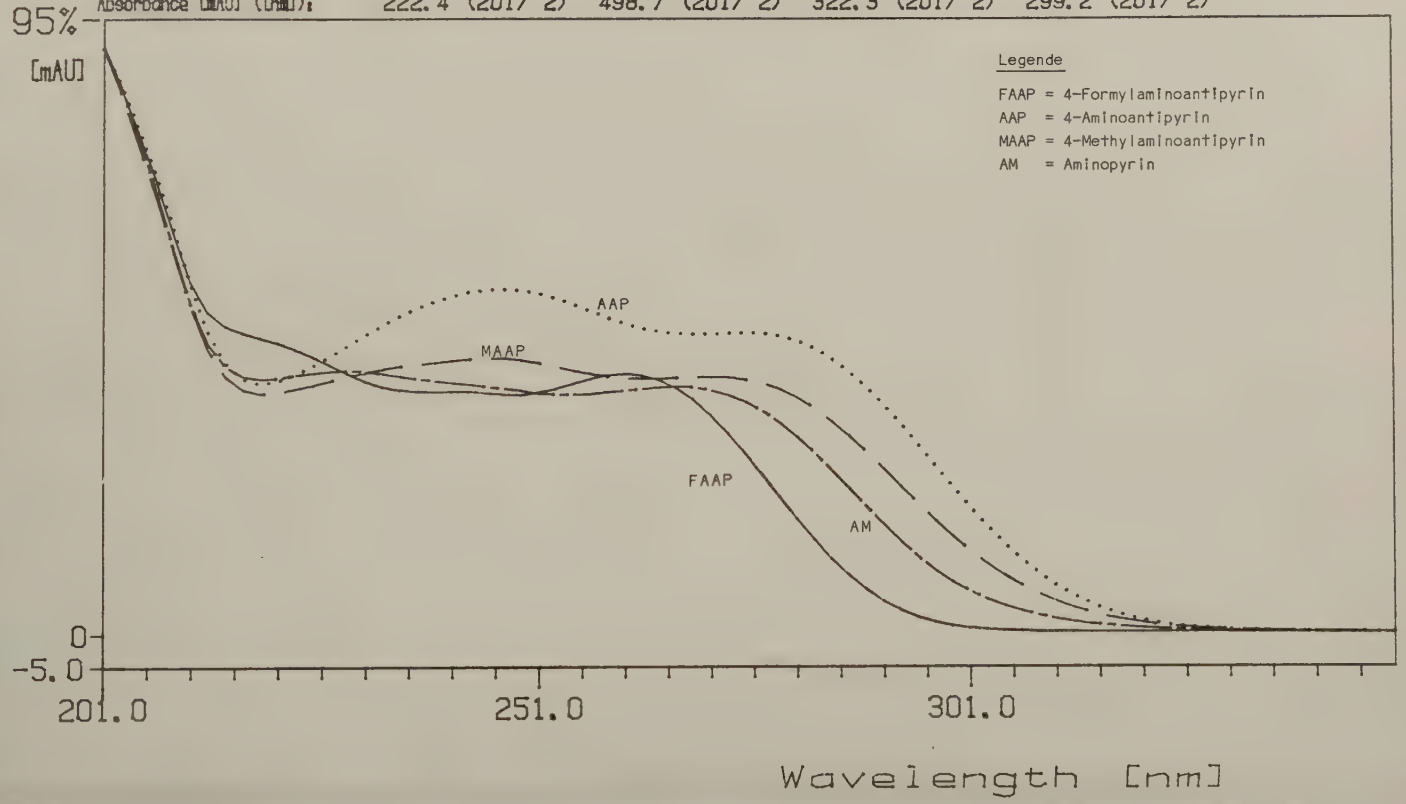


UV-Spektrum von 4-Formylaminoantipyrin (FAAP) in Wasser



hp 1040A

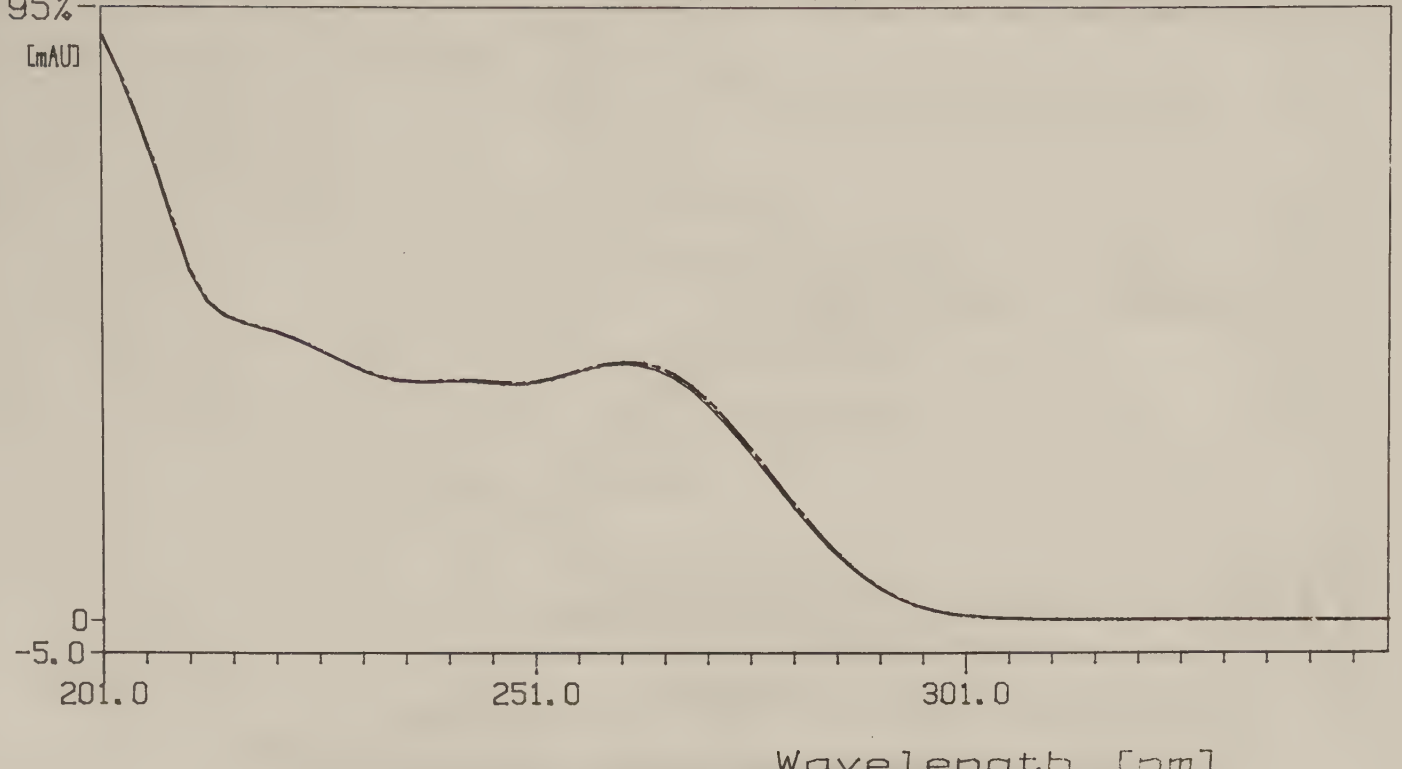
File:	FAAP RAWAMI	AAP RAWAMI	MAAP RAWAMI	AM RAWAMI
Date:	11/29/1982	11/29/1982	11/29/1982	11/29/1982
Spectrum [min]:	5.7202	9.1533	11.1543	12.7083
Reference [min]:	6.4432	9.6188	11.6565	13.2152
Attn [mAU]:	245.8	551.1	356.2	330.7
Absorbance [mAU] ([nm]):	222.4 (201/ 2)	498.7 (201/ 2)	322.3 (201/ 2)	299.2 (201/ 2)



Normierte UV-Spektren der Aminopyrin-Metaboliten (Referenz-substanzen), aufgenommen während einem chromatographischen Lauf.

hp 1040A

File:	UP RAWAMI	UP RAWAMI	APEX RAWAMI	DOWN RAWAMI
Date:	11/29/1982	11/29/1982	11/29/1982	11/29/1982
Spectrum [min]:	5.7202	5.8517	5.9422	6.0710
Reference [min]:	6.4432	6.4432	6.4432	6.4432
Attn [mAU]:	245.8	465.9	784.8	509.2
Absorbance [mAU] ([nm]):	222.4 (201/ 2)	421.5 (201/ 2)	710.1 (201/ 2)	460.7 (201/ 2)



Deckungsgleichheit der normierten UV-Spektren von Formyl- und Acetylaminoantipyrin (Referenzsubstanzen) im analytischen System.

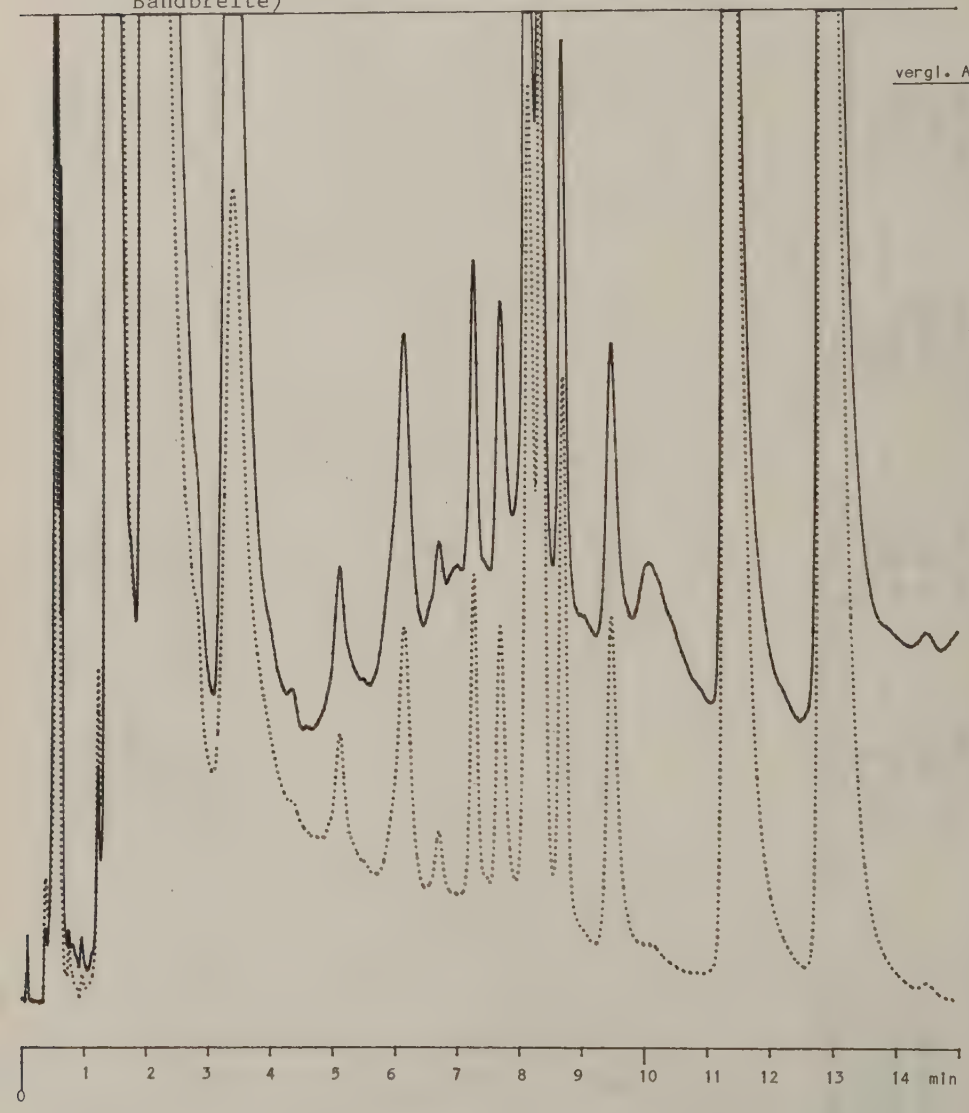
File: AGHEPA
Date: 12/01/1982
Inj. Time: 12:07

230 (4) —— C 3,8: 25.0 (873.7) mAU 5%
260 (30) ..... G 7,8: 25.0 (811.0) mAU 5%

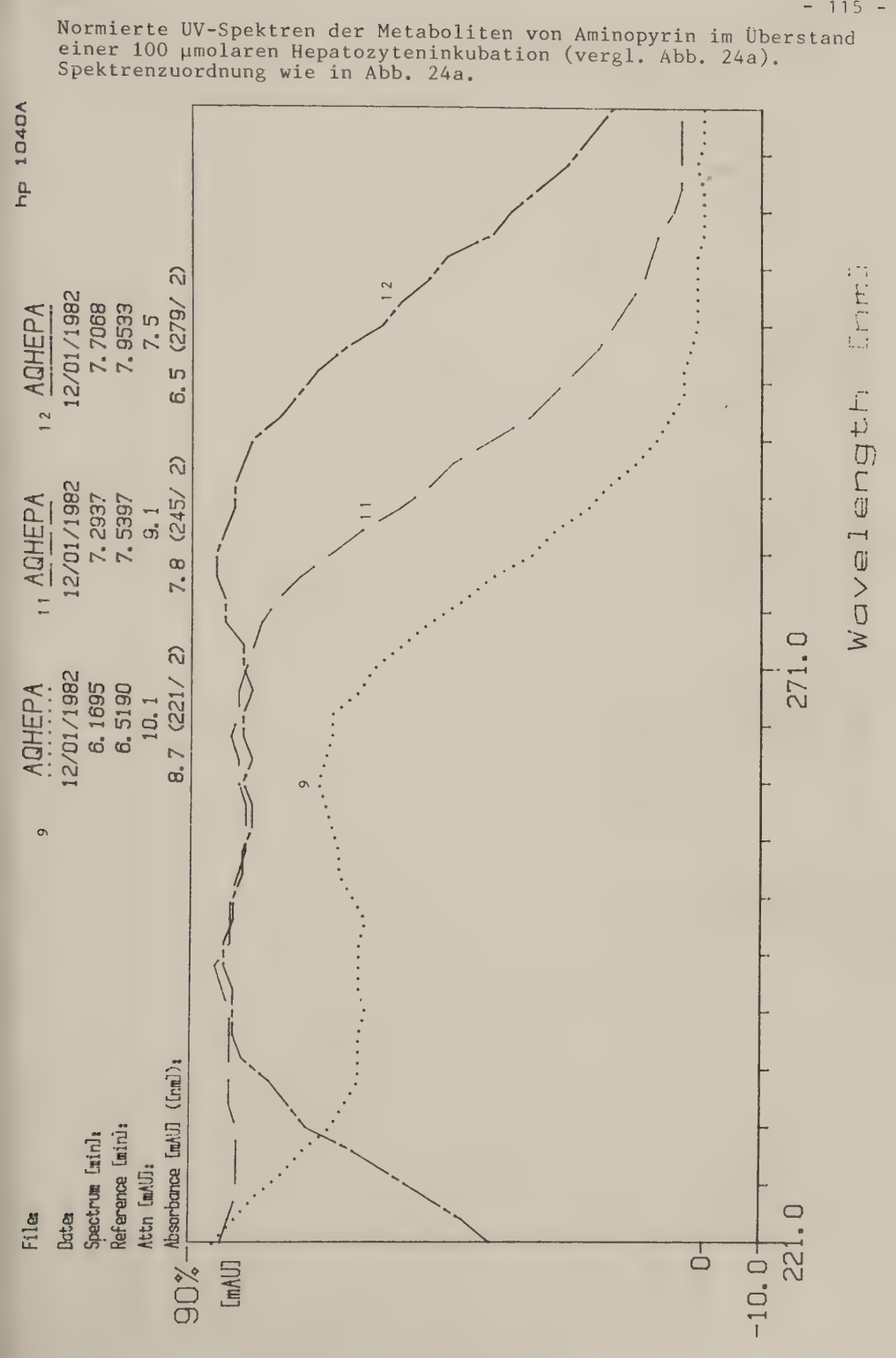
hp 1040A
Wavelength
1. 210. 4
2. 220. 4
3. 230. 4
4. 240. 4
5. 250. 4
6. 260. 4
7. 260. 30
8. 550.100

HPL-Chromatogram der Trennung von Aminopyrin-Metaboliten im Überstand einer 100 µmolaren Hepatozyteninkubation (60 min) bei 230 und 260 nm (4 bzw. 30 nm Bandbreite)

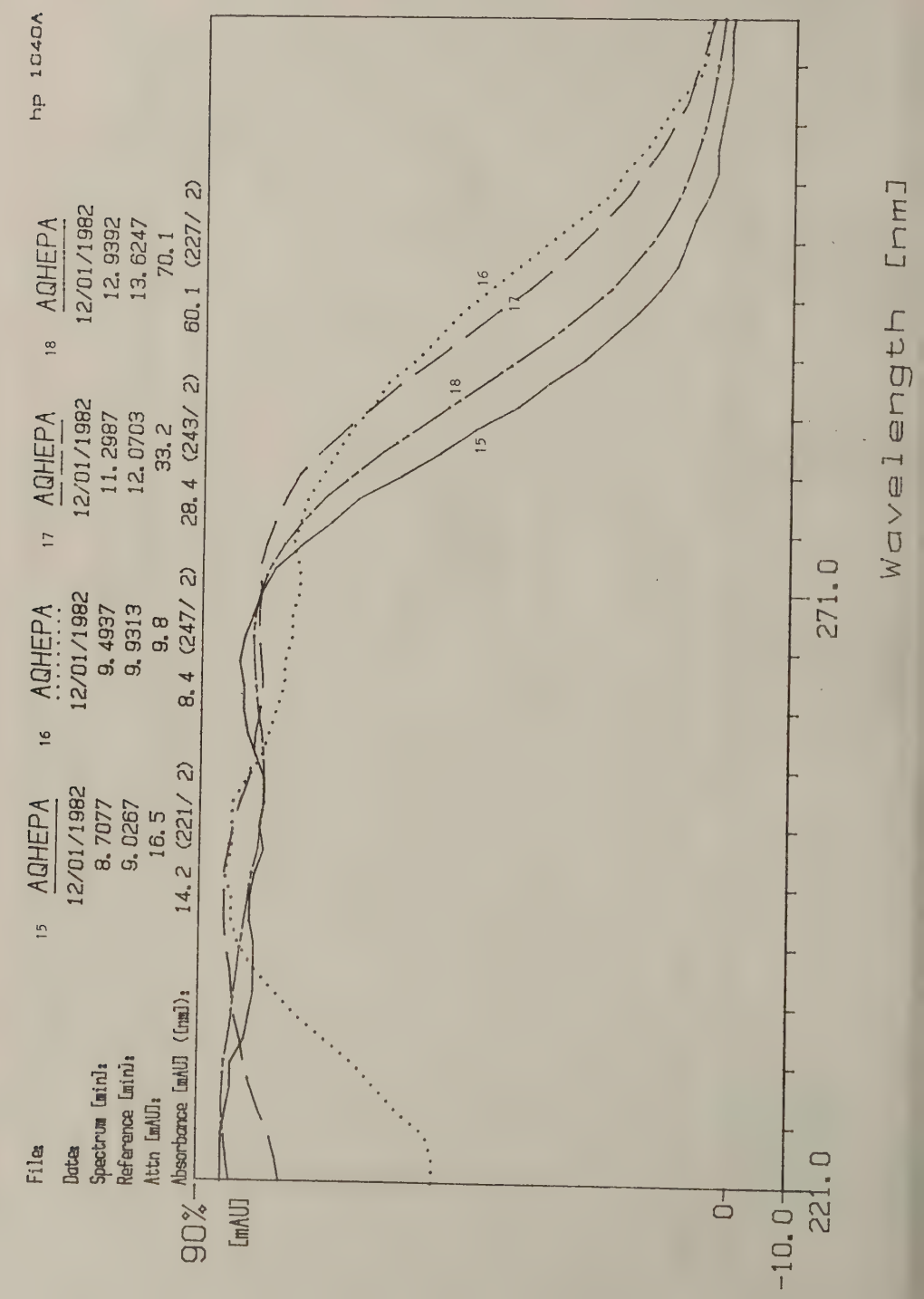
vergl. Abb. 24a



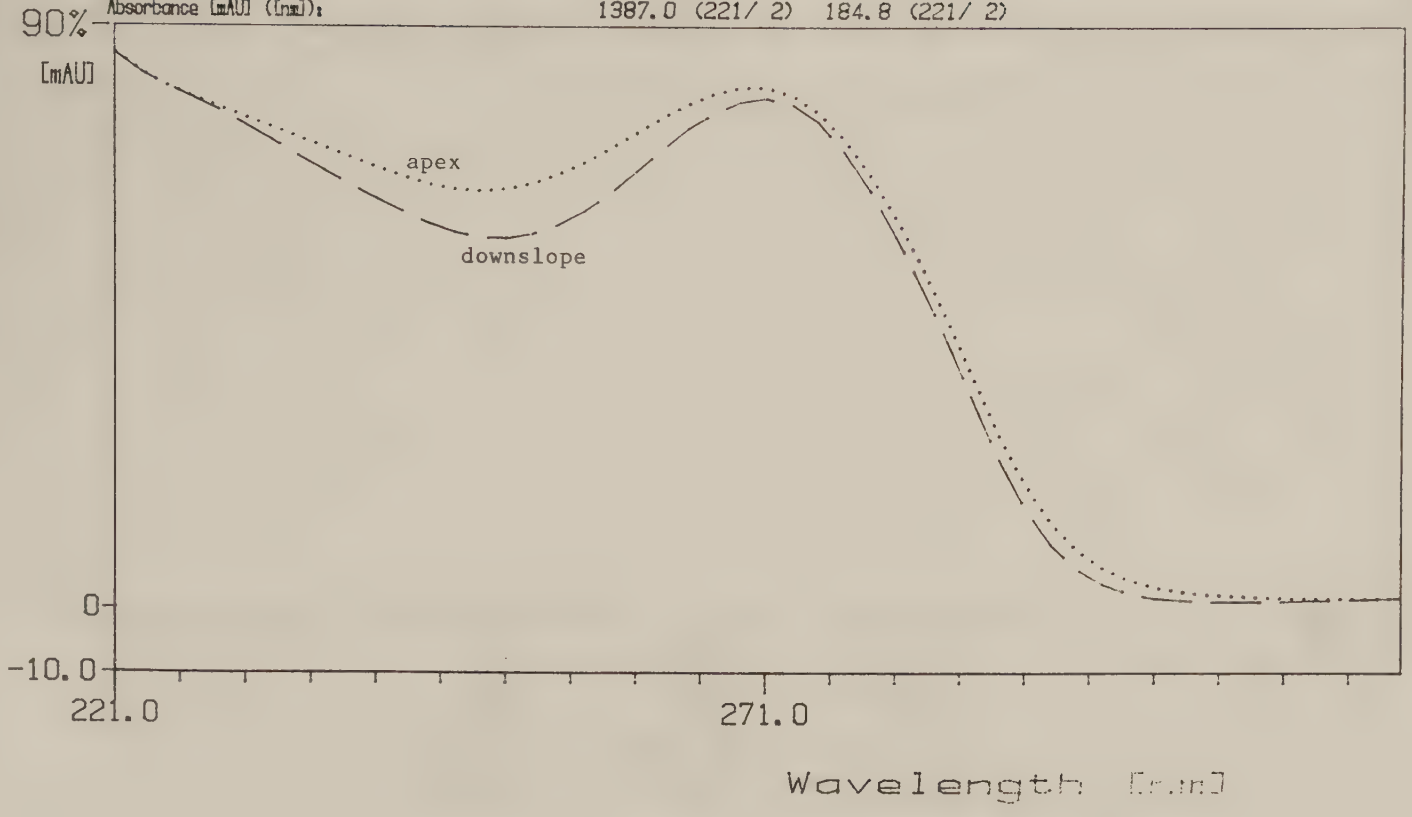
Normierte UV-Spektren der Metaboliten von Aminopyrin im Überstand einer 100 µmolaren Hepatozyteninkubation (vergl. Abb. 24a). Spektrenzuordnung wie in Abb. 24a.



Normierte UV-Spektren der Metaboliten von Aminopyrin im Überstand einer 100 µmolaren Hepatozyteninkubation (vergl. Abb. 24a). Spektrenzuordnung wie in Abb. 24a.



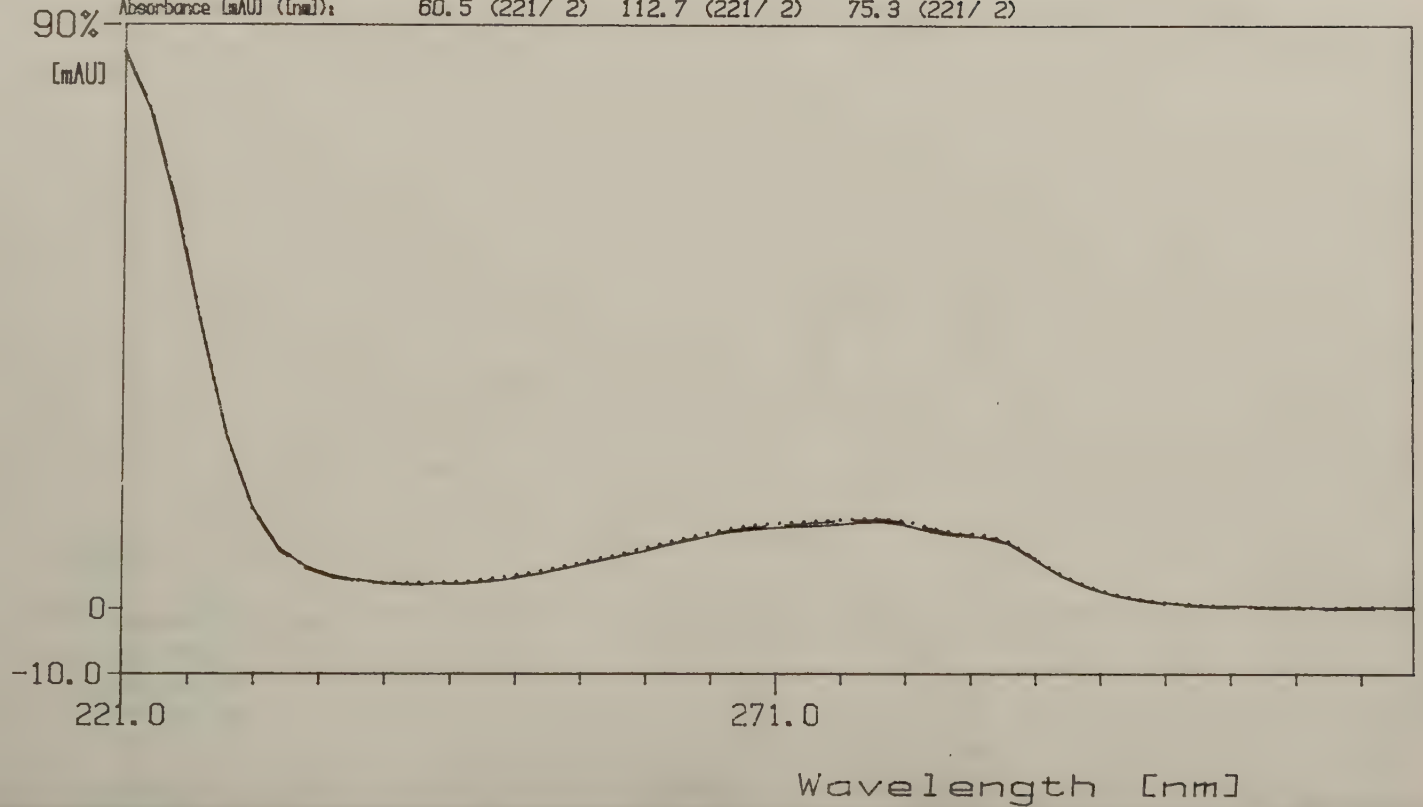
File:	AQHEPA	AQHEPA
Date:	12/01/1982	12/01/1982
Spectrum [min]:	1.3697	1.3948
Reference [min]:	1.4320	1.4320
Attn [mAU]:	1618.1	215.6
Absorbance [mAU] ([nm]):	1387.0 (221/ 2)	184.8 (221/ 2)



Normierte UV-Spektren von FR.2 (vergl. Abb 24a)
<heterogener Peak>

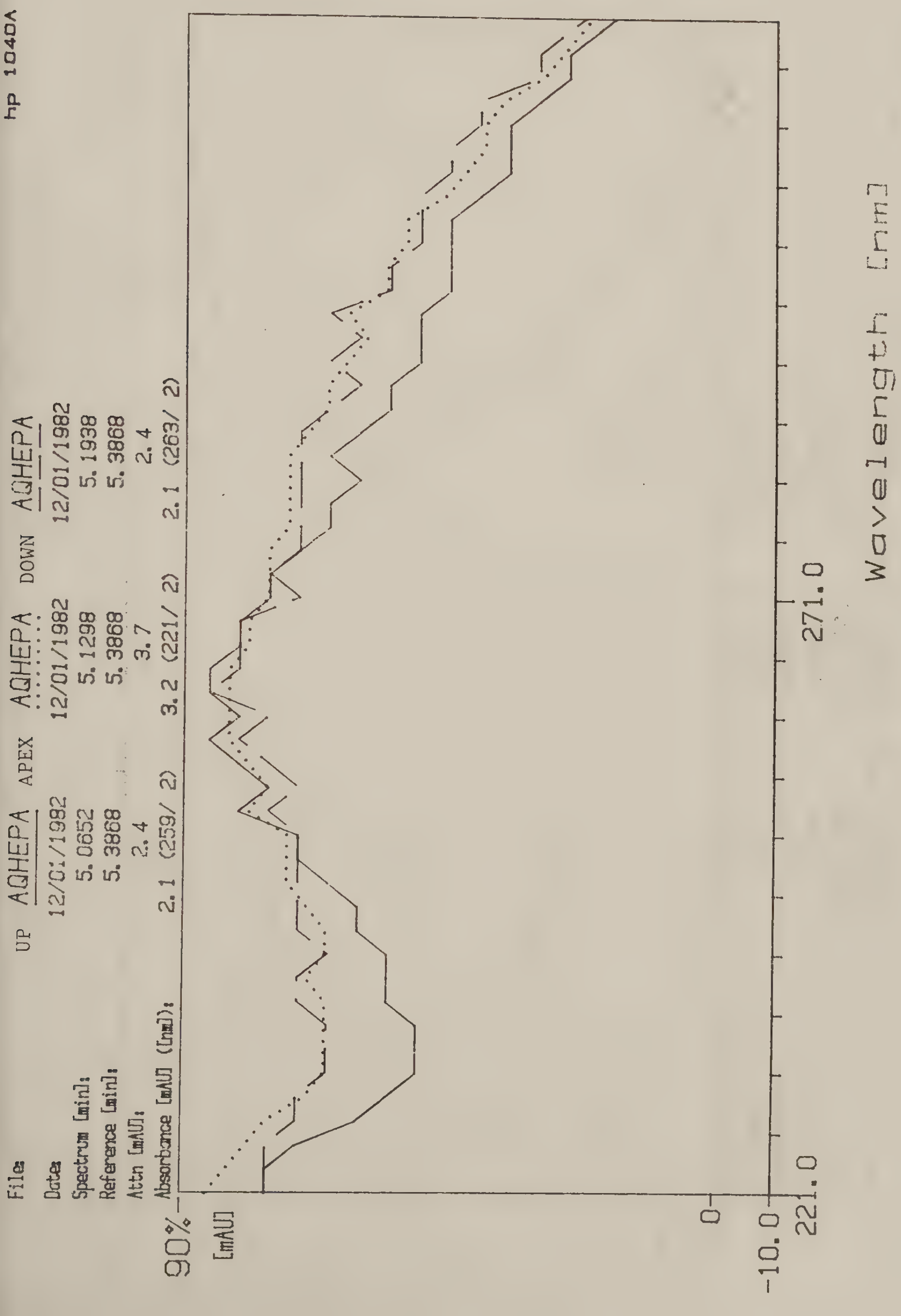
hp 1040A

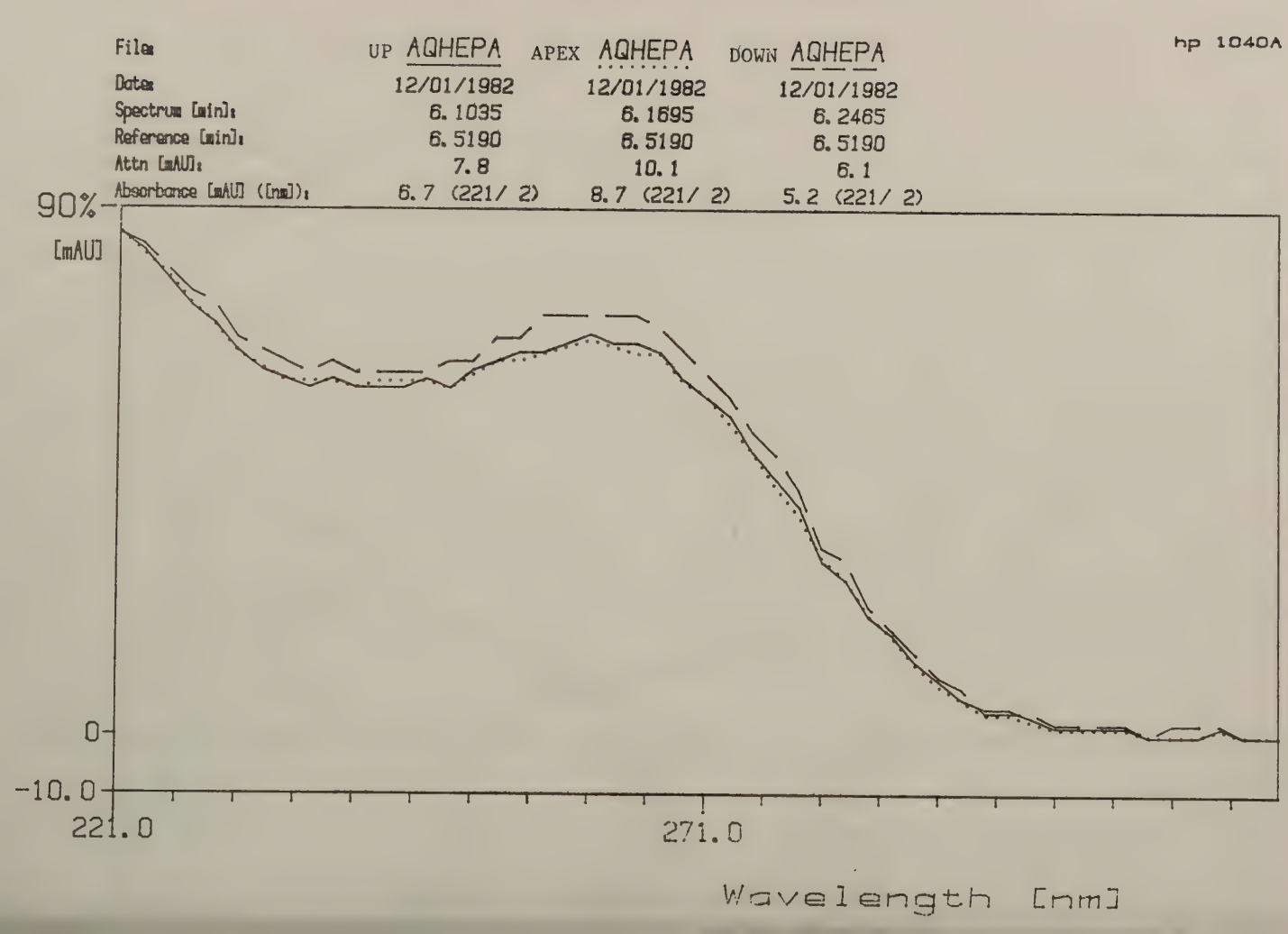
File:	UP AQHEPA	APEX AQHEPA	DOWN AQHEPA
Date:	12/01/1982	12/01/1982	12/01/1982
Spectrum [min]:	3.2987	3.4285	3.5442
Reference [min]:	3.8535	3.8535	3.8535
Attn [mAU]:	70.6	131.4	87.9
Absorbance [mAU] ([nm]):	60.5 (221/ 2)	112.7 (221/ 2)	75.3 (221/ 2)



Normierte UV-Spektren von FR. 7 (vergl. Abb. 24a)
<homogener Peak>

Normierte UV-Spektren von FR.8 (vergl. Abb. 24a)

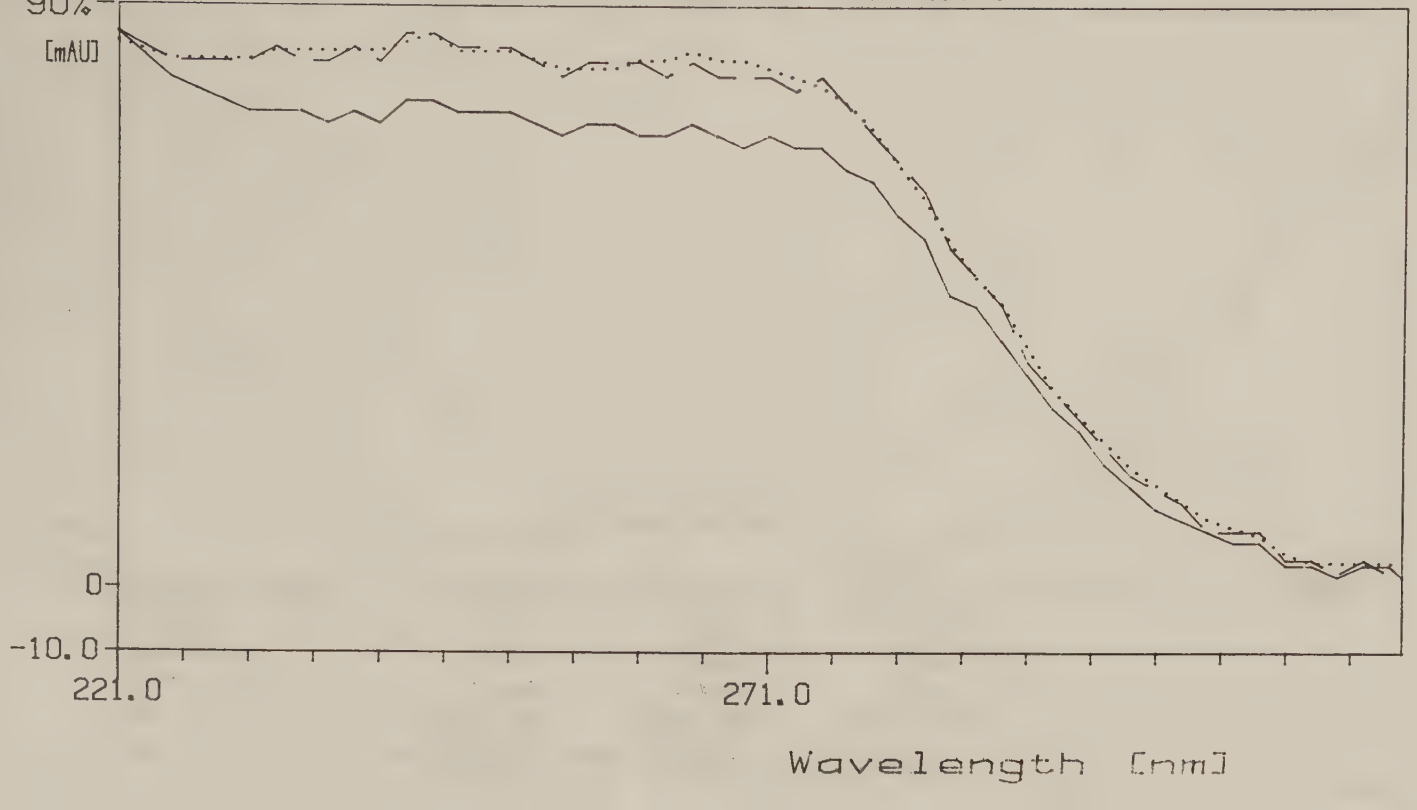




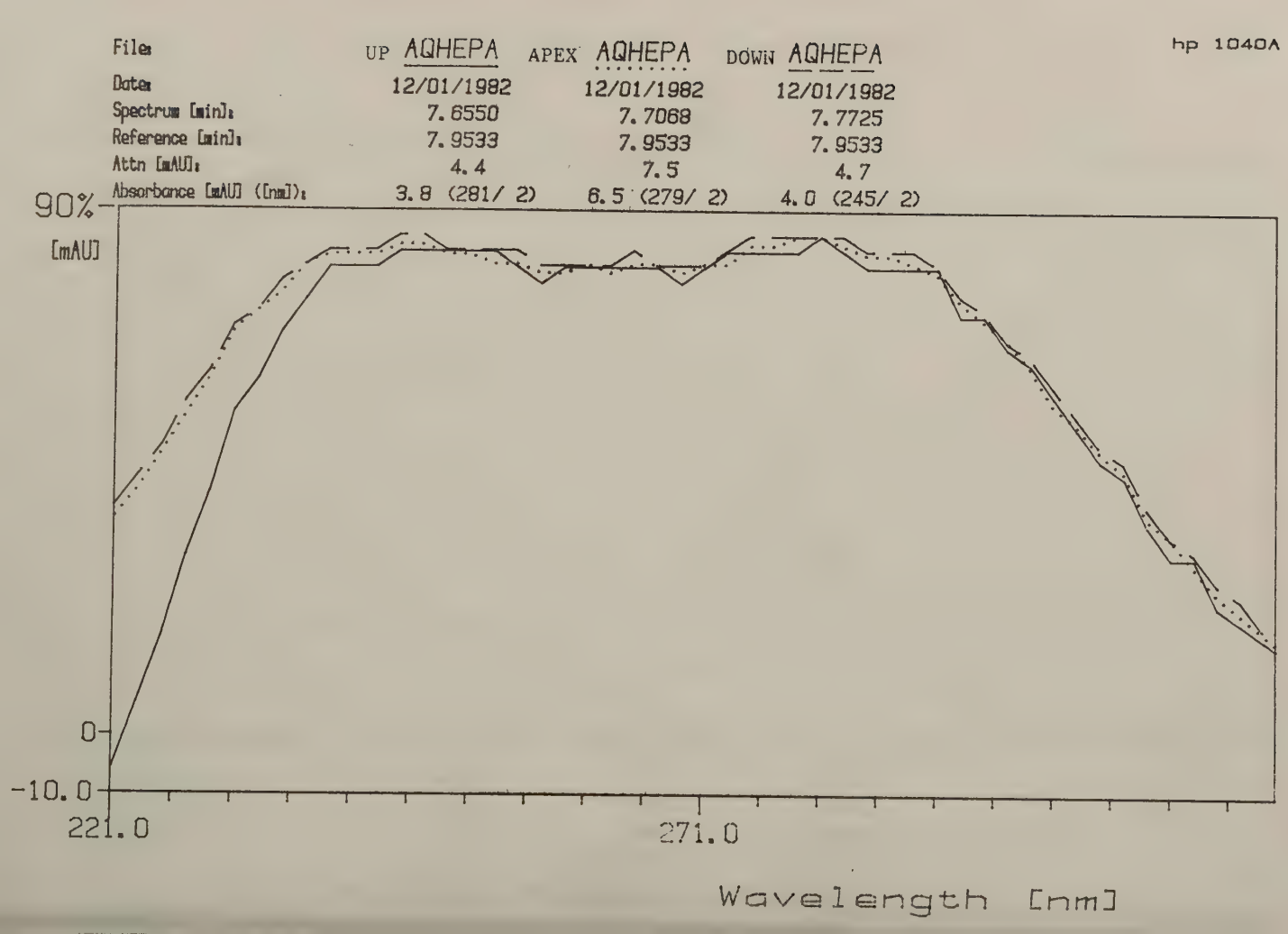
Normierte UV-Spektren von FR.9 (vergl. Abb. 24a).

hp 1040A

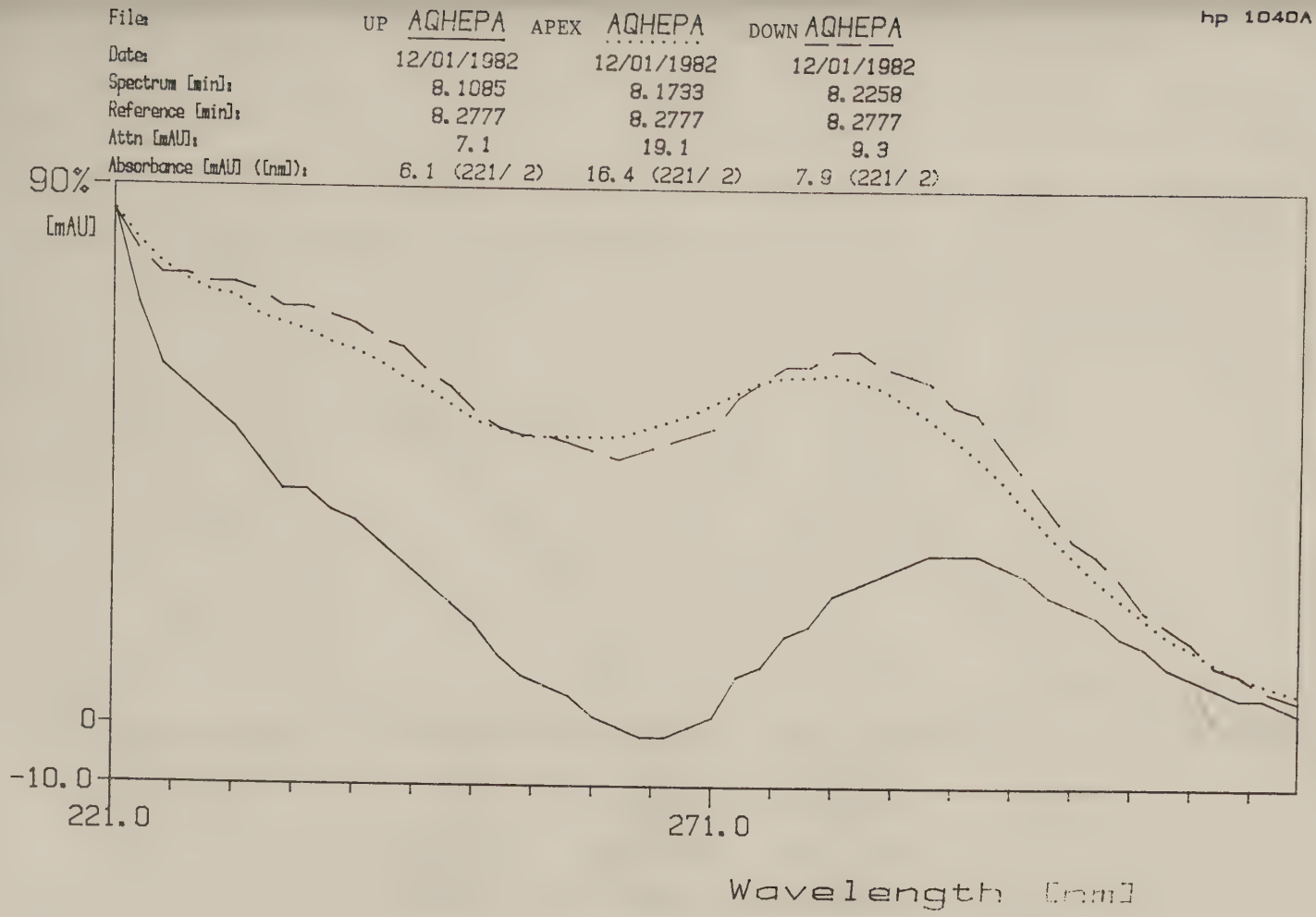
File:	UP AQHEPA	APEX AQHEPA	DOWN AQHEPA
Date:	12/01/1982	12/01/1982	12/01/1982
Spectrum [min]:	7.2428	7.2937	7.3333
Reference [min]:	7.5397	7.5397	7.5397
Attn [mAU]:	7.0	9.1	5.6
Absorbance [mAU] ([nm]):	6.0 (221/ 2)	7.8 (245/ 2)	4.8 (221/ 2)



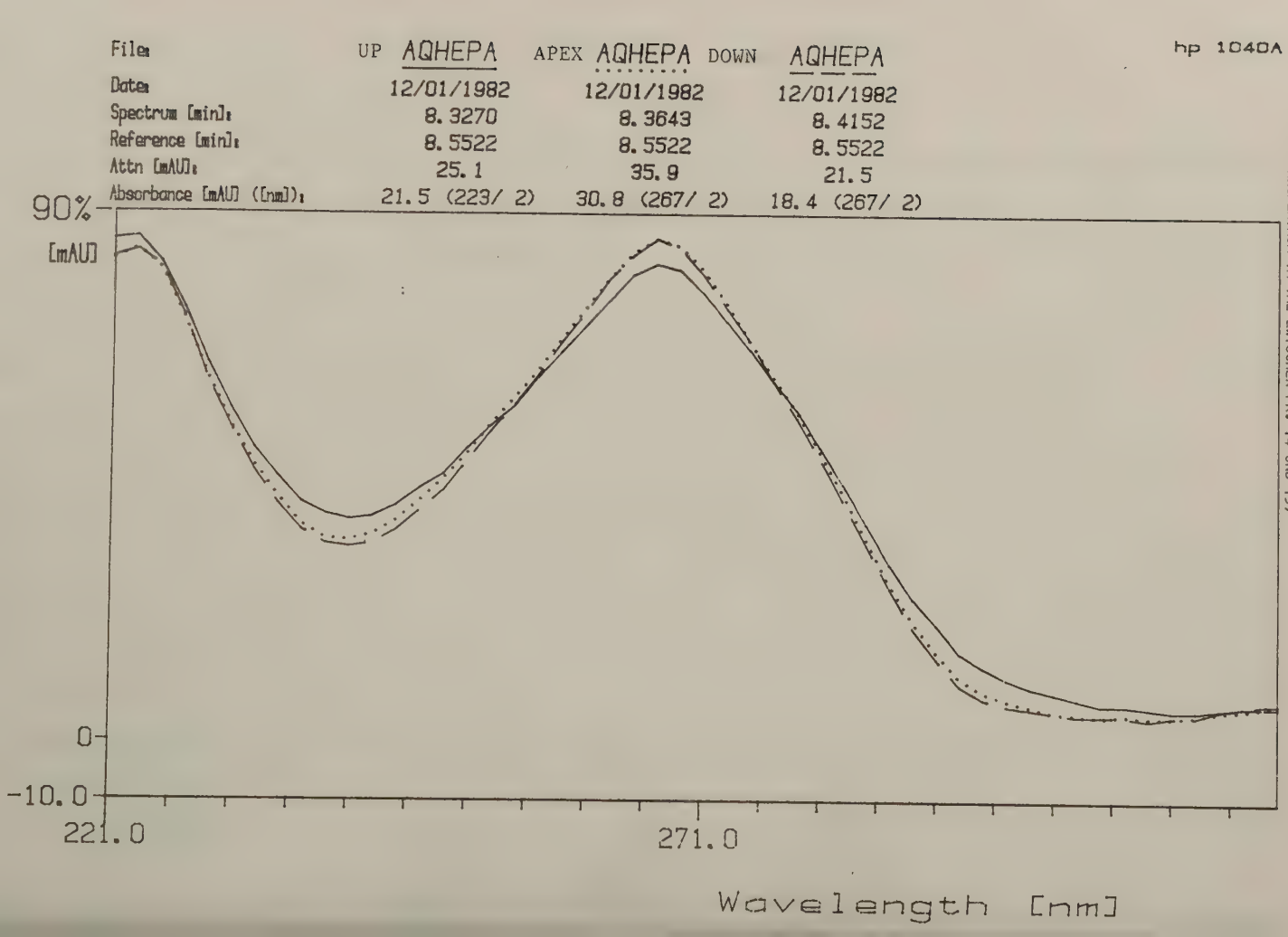
Normierte UV-Spektren von FR. 11 (vergl. Abb. 24a)



Normierte UV-Spektren von FR. 12 (vergl. Abb. 24a)



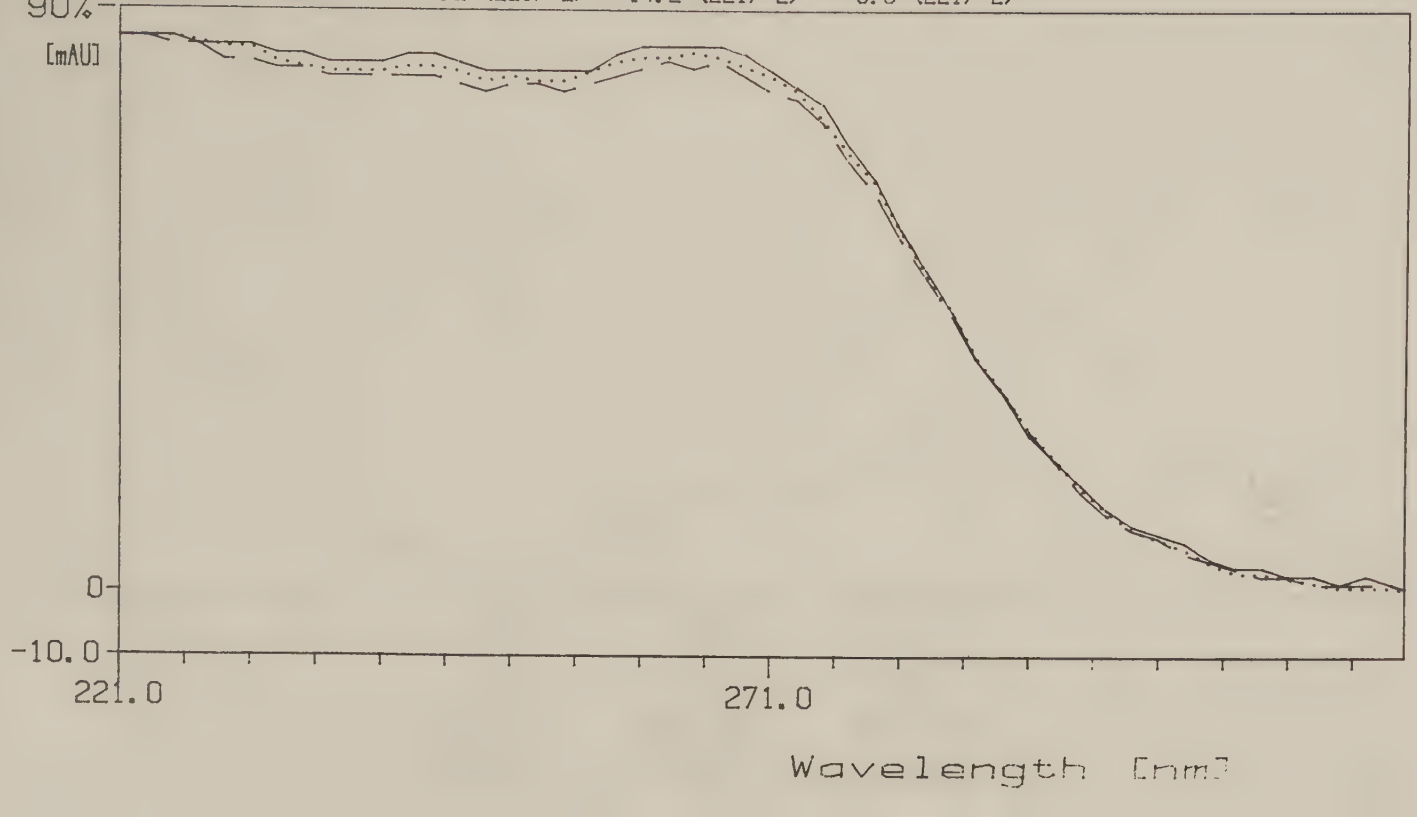
Normierte UV-Spektren von FR. 13 (vergl. Abb. 24a)



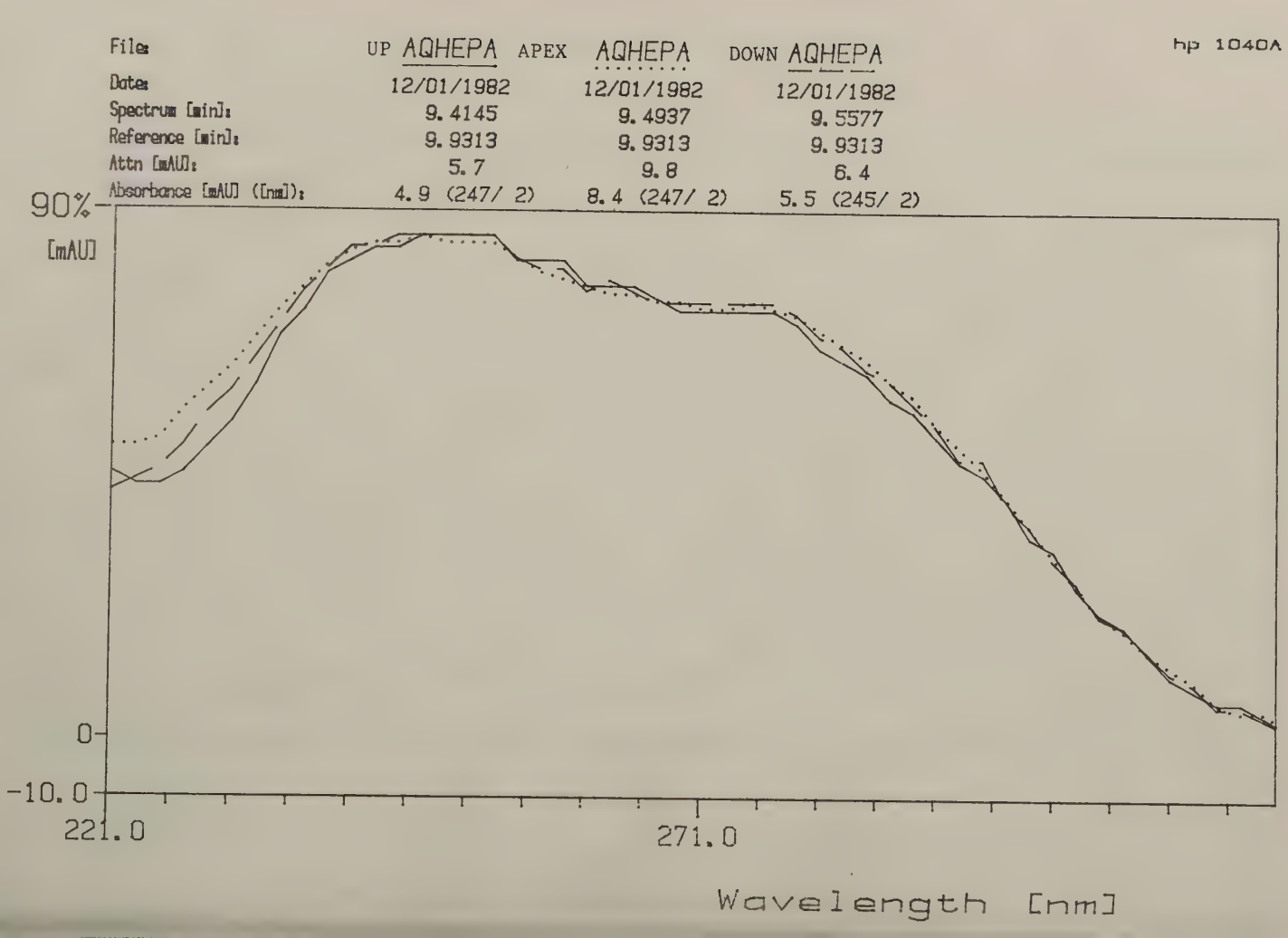
Normierte UV-Spektren von FR. 14 (vergl. Abb. 24a)

hp 1040A

File:	UP AQHEPA	APEX AQHEPA	DOWN AQHEPA
Date:	12/01/1982	12/01/1982	12/01/1982
Spectrum [min]:	8.6548	8.7077	8.7583
Reference [min]:	9.0267	9.0267	9.0267
Attn [mAU]:	9.5	16.5	10.3
Absorbance [mAU] ([nm]):	8.2 (221/ 2)	14.2 (221/ 2)	8.8 (221/ 2)



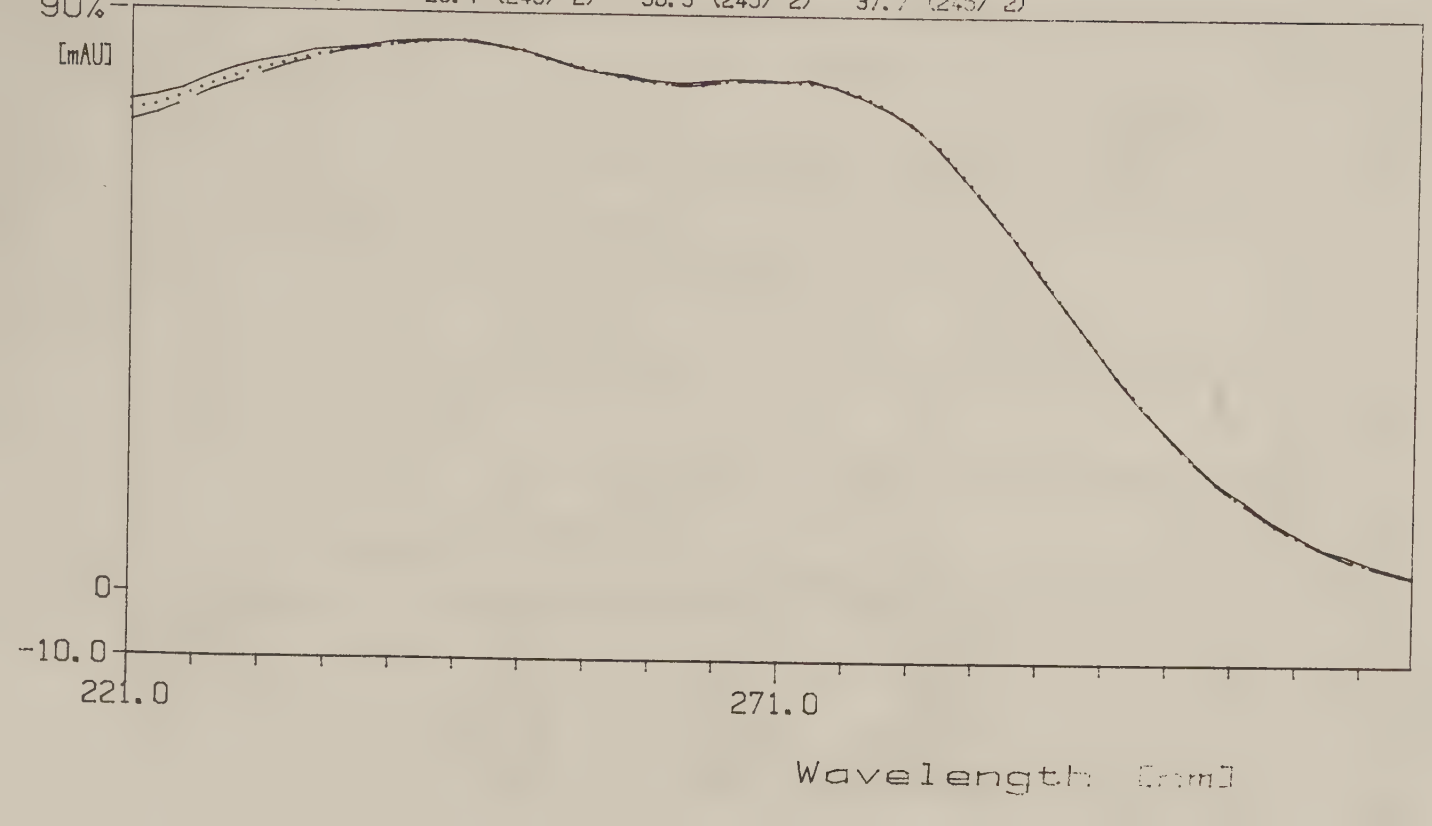
Normierte UV-Spektren von FR. 15 (vergl. Abb. 24a)



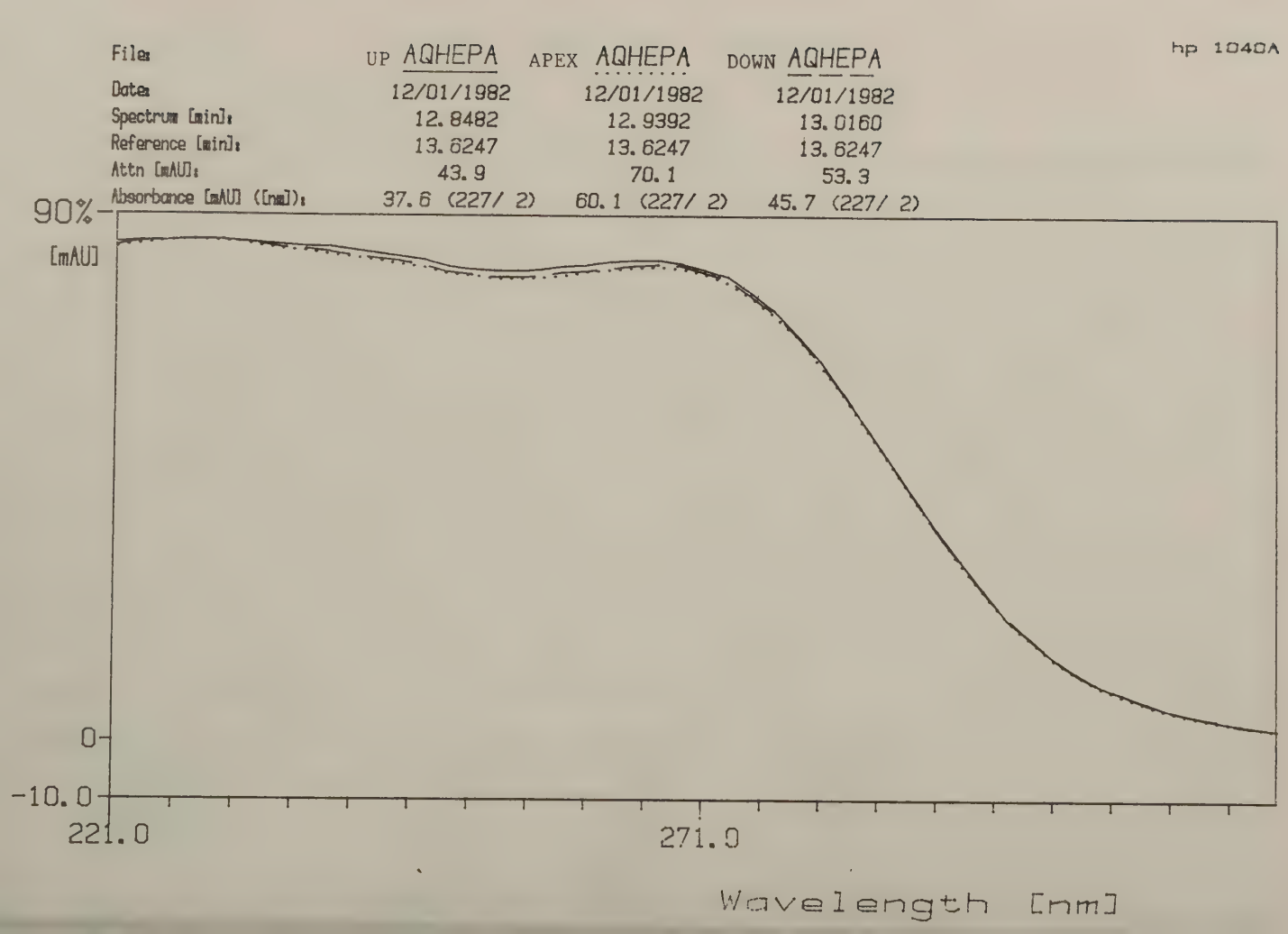
Normierte UV-Spektren von FR. 16 (AAP; vergl. Abb. 24a)

hp 1040A

File:	UP AQHEPA	APEX AQHEPA	DOWN AQHEPA
Date:	12/01/1982	12/01/1982	12/01/1982
Spectrum [min]:	11.2987	11.3758	11.4537
Reference [min]:	12.0703	12.0703	12.0703
Attn [mAU]:	33.2	58.7	44.0
Absorbance [mAU] ([nm]):	28.4 (243/ 2)	50.3 (245/ 2)	37.7 (245/ 2)



Normierte UV-Spektren von FR. 17 (MAAP; vergl. Abb. 24a)



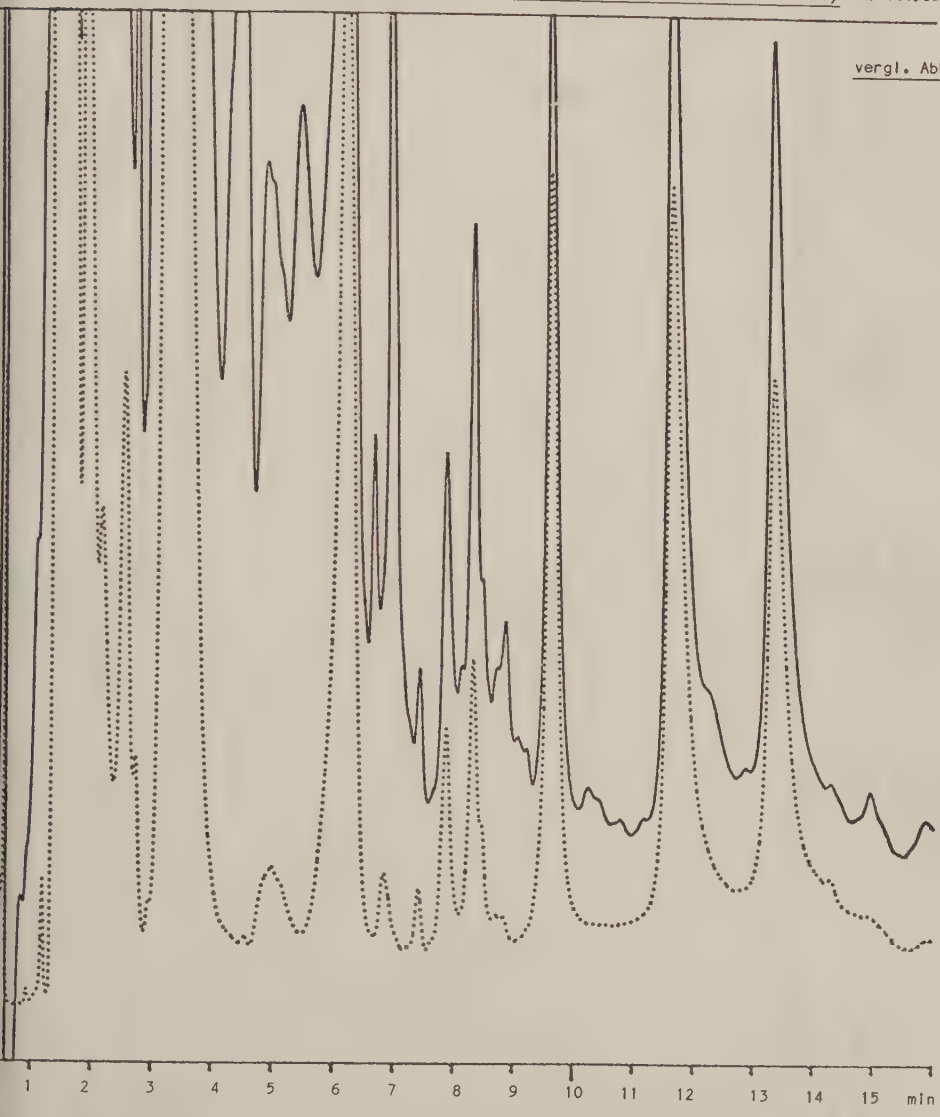
Normierte UV-Spektren von FR. 18 (Aminopyrin; vergl. Abb. 24a)

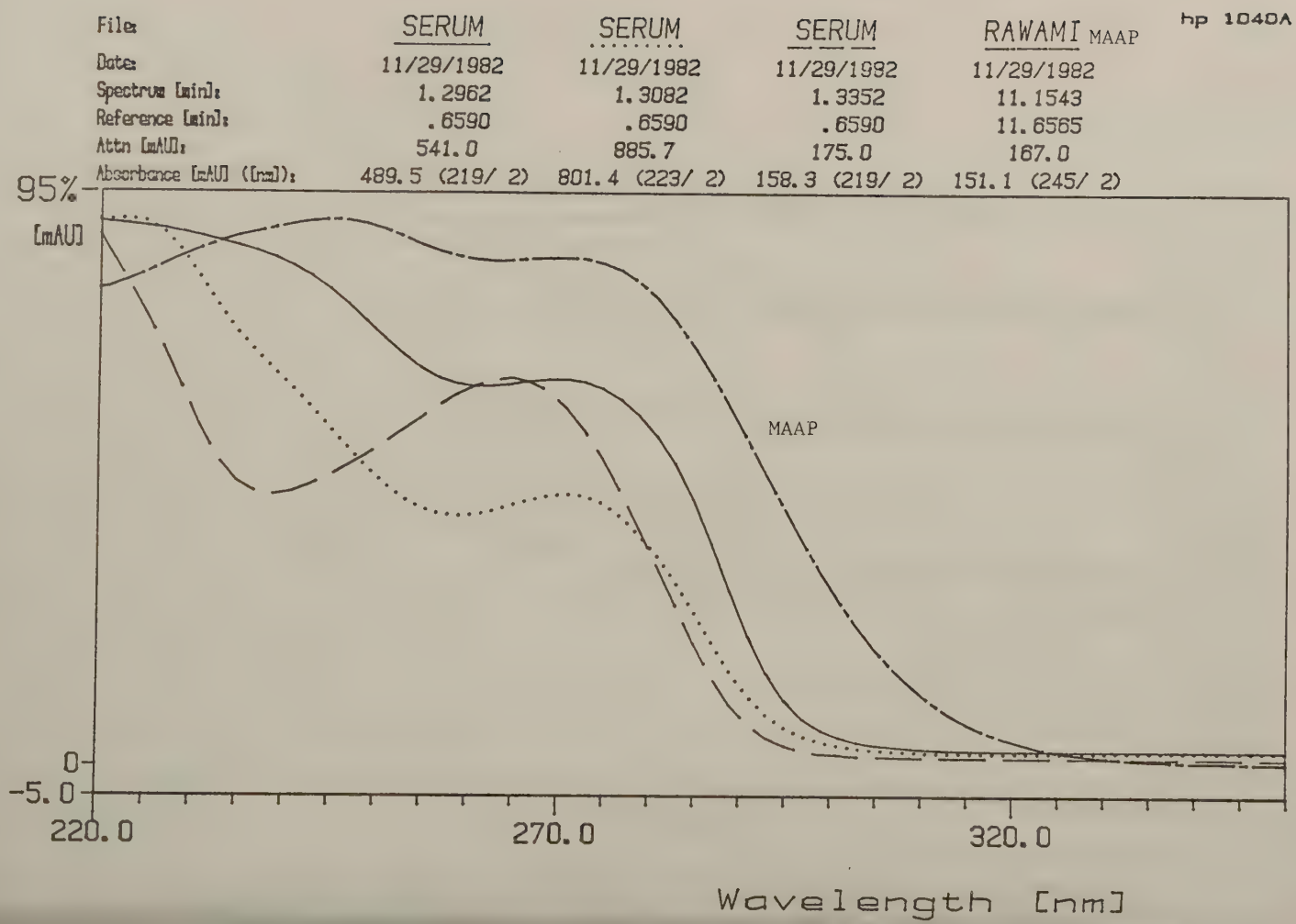
SERUM 210 nm ____ A 1,8: 50.0 (1064.6) mAU 5%
11/29/1982 260 nm ..... B 5,8: 50.0 (435.9) mAU 5%
Time: 18:12

hp 1040A
Wavelength
1. 210, 4
2. 220, 4
3. 230, 4
4. 260, 80
5. 280, 4
6. 280, 4
7. 500, 4
8. 550,100

HPL-Chromatogram der Trennung von Aminopyrin-Metaboliten in Rattenplasma 2 Std. nach p.o. Applikation von 20 mg/kg Aminopyrin bei 210 und 260 nm (Bandbreite 4nm)

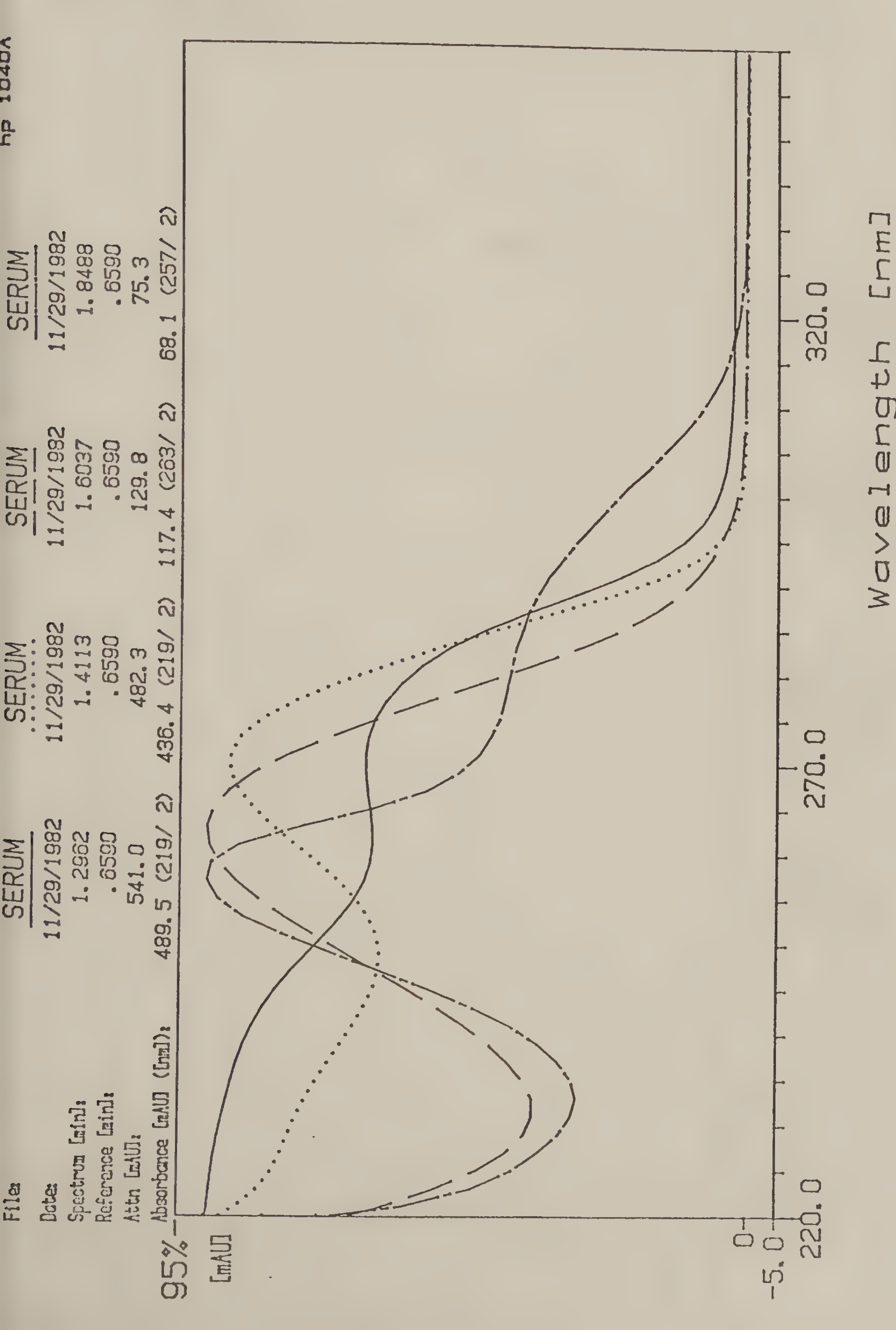
vergl. Abb. 24b

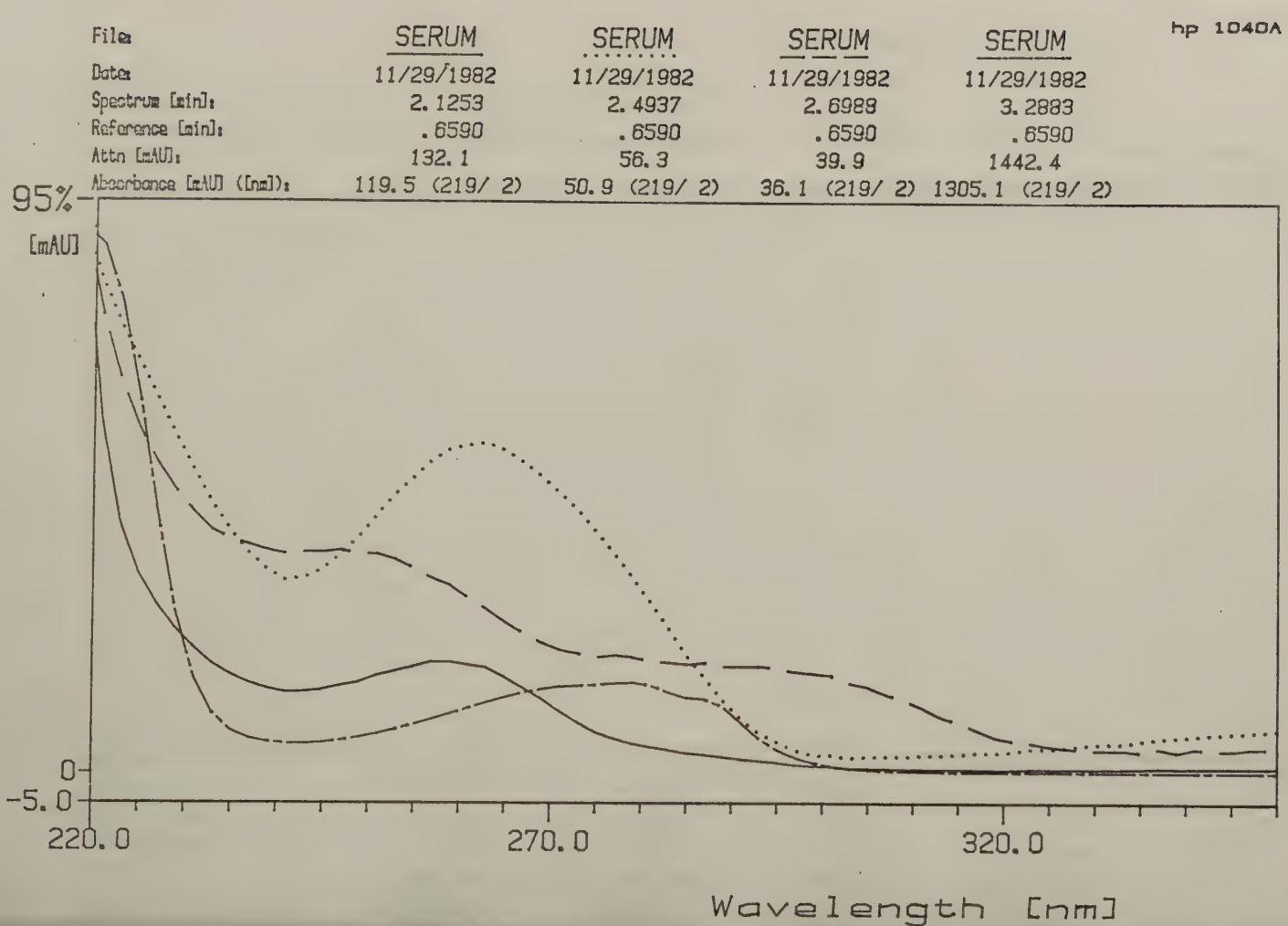




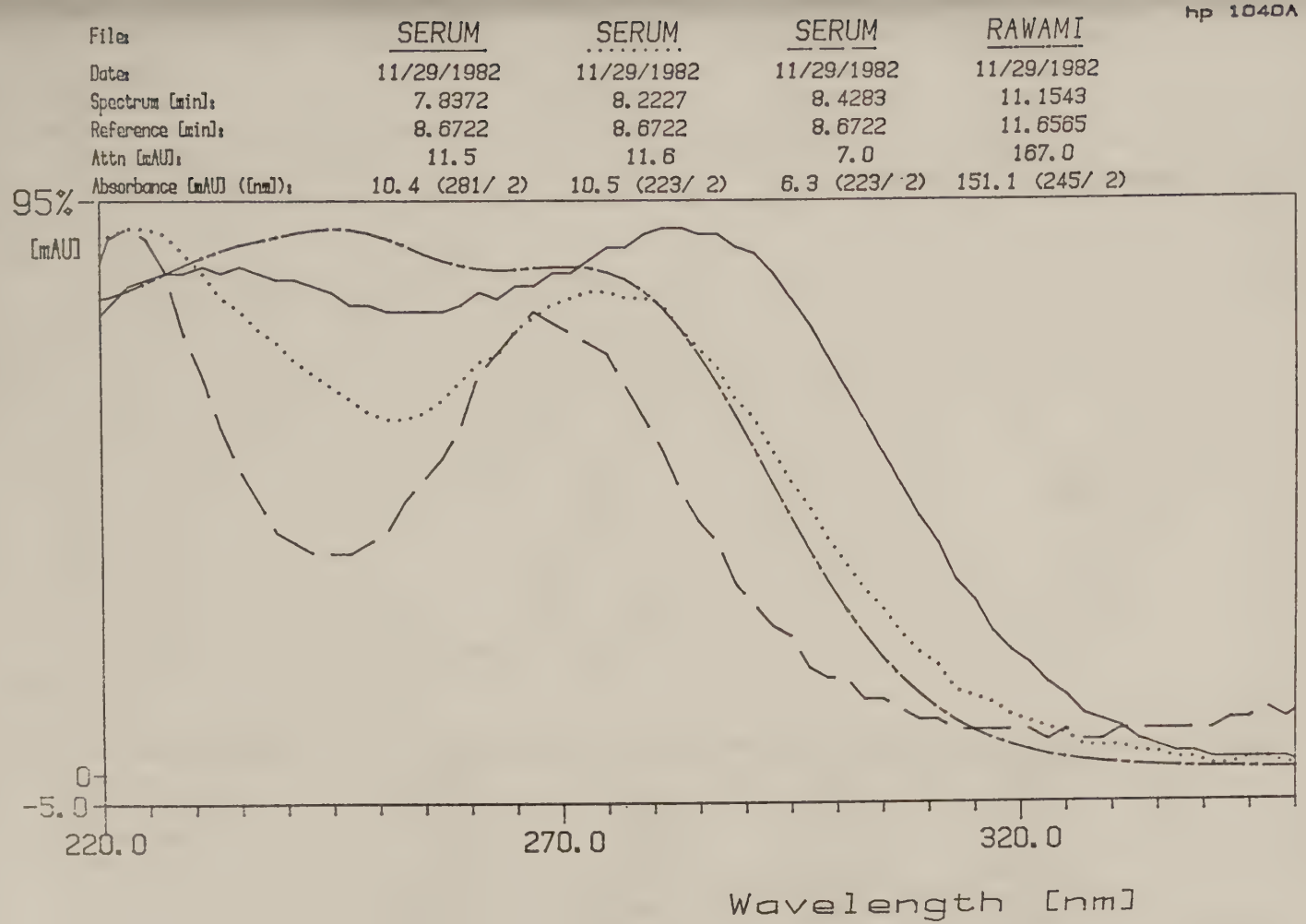
Gegenüberstellung der normierten UV-Spektren von stark polaren Komponenten aus Rattenplasma (SERUM) mit dem Referenzspektrum von MAAP (RAWAMI) (vergl. Abb. 24b).

Normierte UV-Spektren stark polarer Komponenten aus Rattenplasma (vergl. Abb. 24b).



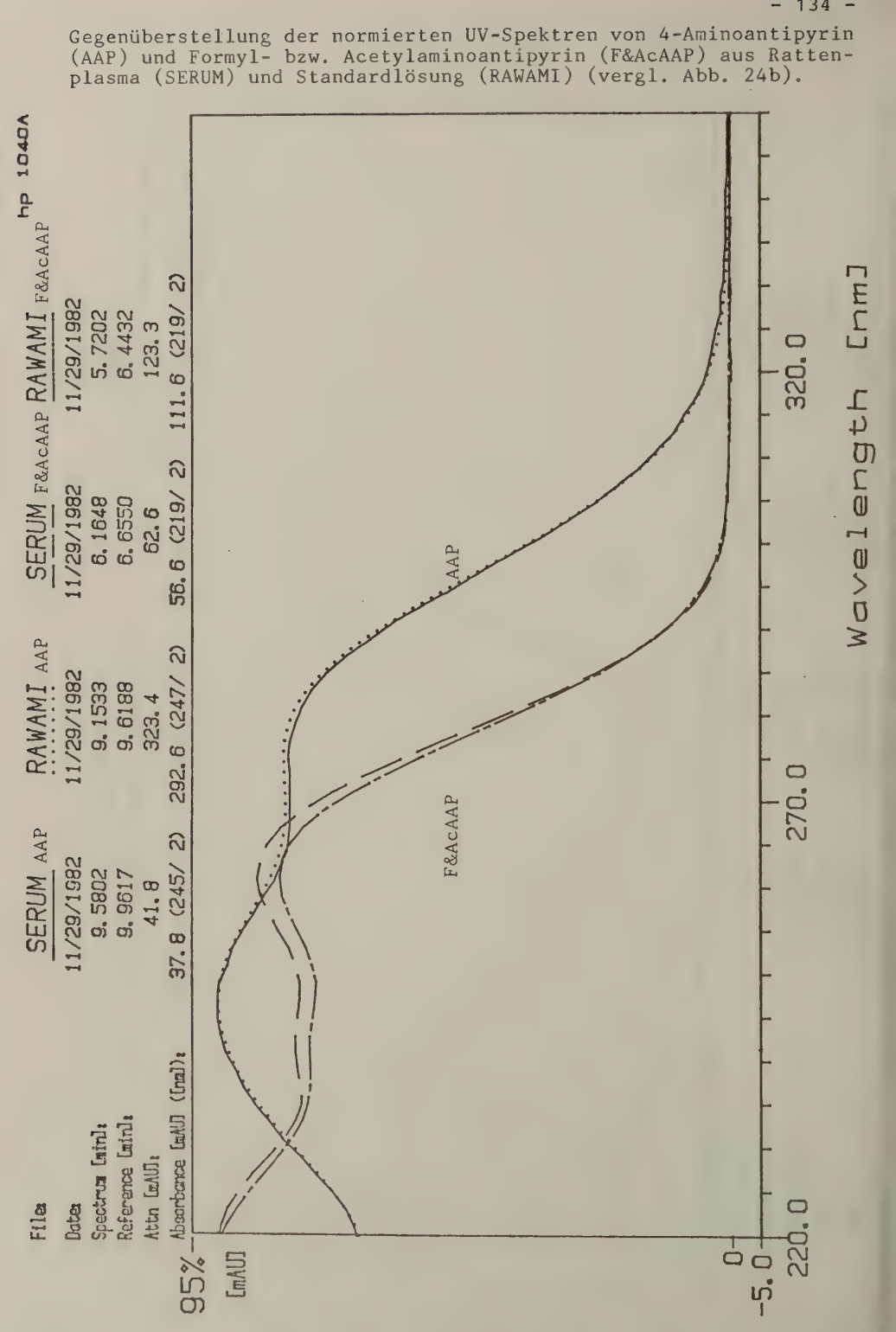


Normierte UV-Spektren polarer Komponenten aus Rattenplasma (vergl. Abb. 24b).

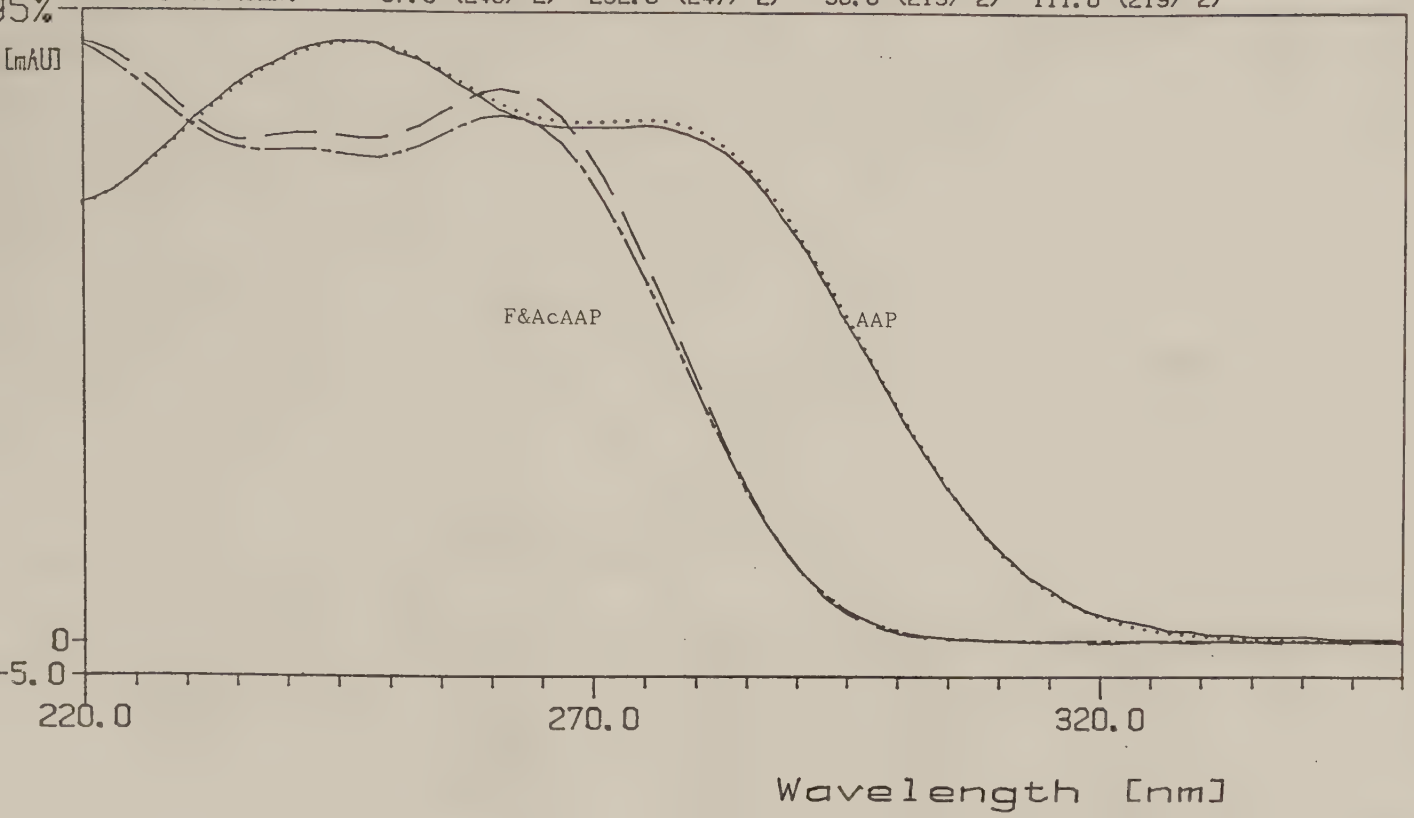


Gegenüberstellung der normierten UV-Spektren mittelpolarer Komponenten aus Rattenplasma (SERUM) mit dem Referenzspektrum von MAAP (vergl. Abb. 24b).

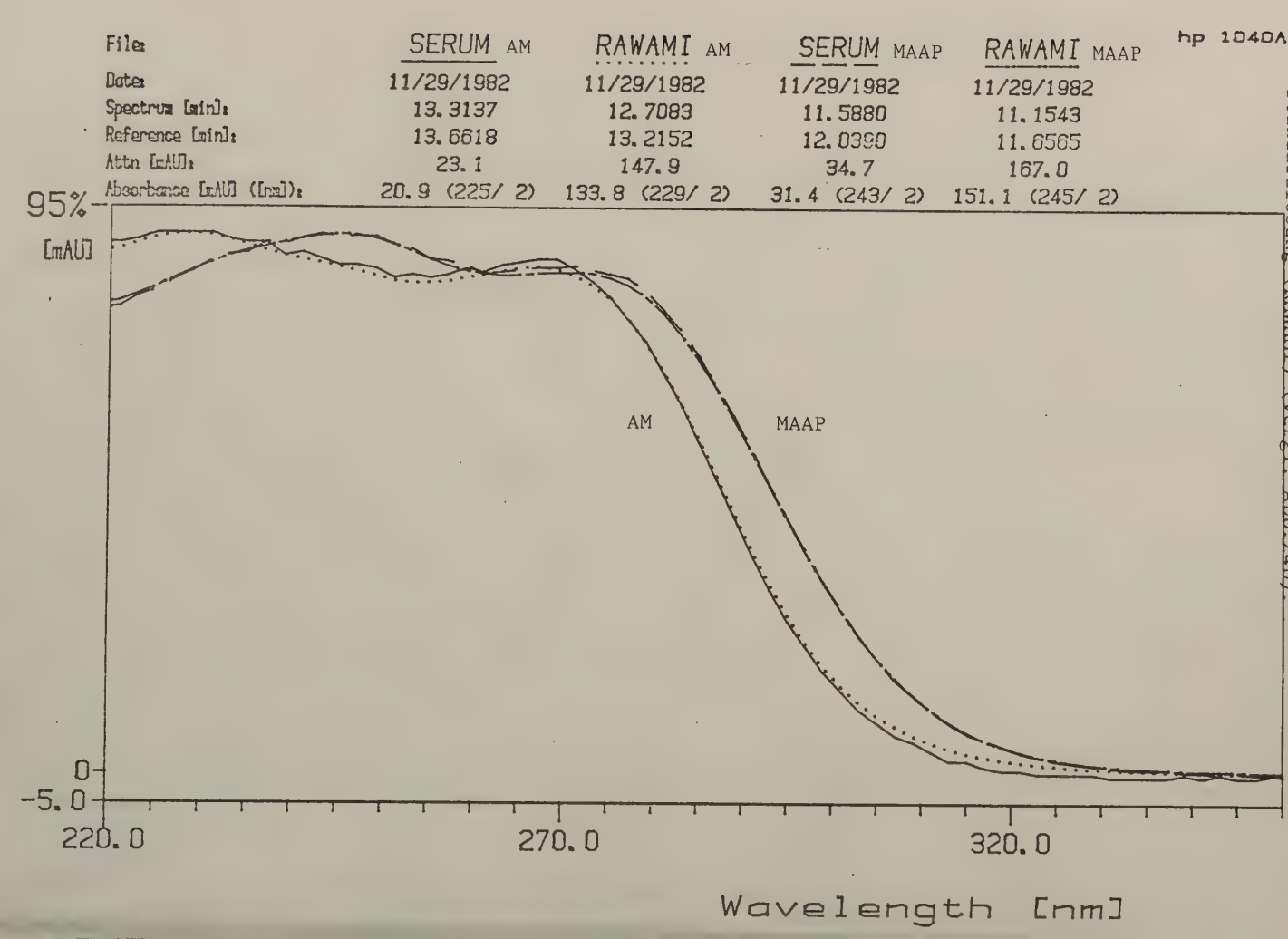
Gegenüberstellung der normierten UV-Spektren von 4-Aminoantipyrin (AAP) und Formyl- bzw. Acetylaminoantipyrin (F&AcAAP) aus Rattenplasma (SERUM) und Standardlösung (RAWAMI) (vergl. Abb. 24b).



File:	SERUM AAP	RAWAMI AAP	SERUM F&AcAAP	RAWAMI F&AcAAP
Date:	11/29/1982	11/29/1982	11/29/1982	11/29/1982
Spectrum [min]:	9.5802	9.1533	6.1648	5.7202
Reference [min]:	9.9617	9.6188	6.6550	6.4432
Attn [mAU]:	41.8	323.4	62.6	123.3
Absorbance [mAU] ([nm]):	37.8 (245/ 2)	292.6 (247/ 2)	56.6 (219/ 2)	111.6 (219/ 2)



Gegenüberstellung der normierten UV-Spektren von 4-Aminoantipyrin (AAP) und Formyl- bzw. Acetylaminoantipyrin (F&AcAAP) aus Rattenplasma (SERUM) und Standardlösung (RAWAMI) (vergl. Abb. 24b).



Gegenüberstellung der normierten UV-Spektren von Aminopyrin (AM) und 4-Methylaminoantipyrin (MAAP) aus Rattenplasma (SERUM) und Standardlösung (RAWAMI) (vergl. Abb.24b).

8. Zusammenfassung

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit können isolierte Hepatozyten von Ratte und Maus charakterisiert werden als ein Modellsystem hoher in vitro-in vivo-Korrelation bei Phase-I-Biotransformationsreaktionen. Dieses Modellsystem macht Metabolitenstrukturen leicht zugänglich, läßt den Einfluß der Serumalbuminbindung auf die Biotransformation untersuchen und kann unterschiedliches pharmakodynamisches Verhalten erklären, wenn dieses auf Unterschieden in der Biotransformation beruht. Im Verbund mit pharmakodynamsichen Untersuchungen können isolierte Hepatozyten somit zur Optimierung der pharmakologsichen Wirkung eingesetzt werden.

Diese Ergebnisse werden durch Untersuchung des Metabolitsmus ausgewählter Fremdsubstanzen (Aminopyrin, Benzaron, N-alkylsubstituierte 4,4-Diphenylpiperidine, Lonazolac) mit Hilfe einer entwickelten hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Vorsäulentechnik erhalten, die die Probenaufarbeitung und -anreicherung in das analytische System integriert. Genauigkeit und Reproduzierbarkeit dieser Technik werden unter Beweis gestellt und die allgemeine Anwendbarkeit wird an weiteren Beispielen (Naftidofuryl, Bufuralol) demonstriert.

Von den Aminopyrinmetaboliten konnten durch UV-Spektroskopie, Massenspektrometrie und chromatographisches Verhalten 4-Methylaminoantipyrin, 4-Aminoantipyrin, 4-Formylaminoantipyrin, 3-Hydroxymethylaminopyrin, 3-Hydroxymethyl-4-methylaminoantipyrin und 2-Hydroxymethylaminopyrin als Phase-I-Produkte identifiziert werden. 2-Hydroxymethylaminopyrin wird erstmals als Metabolit von Aminopyrin beschrieben. Die niedrigen Konzentrationen des einzigen detektierten Phase-II-Metaboliten 4-Acetylaminoantipyrin in Hepatozytensuspensionen von Ratte und Maus weisen darauf hin, daß die Acetylierung von Fremdsubstanzen - in Übereinstimmung mit Ergebnissen der Litertur - überwiegend außerhalb der Parenchymzellen abläuft.

4-Formyl- und 4-Acetylaminoantipyrin werden in Hepatozytensuspensionen von Meerschweinchen nicht aufgefunden. Meerschweinchenhepatozyten sind auch durch die hier angewandt Methoden nicht mit derselben hohen Vitalität wie bei Ratte und Maus präparierbar, was deren Aussagefähigkeit als Modellsystem für die in vivo-Biotransformation mindert.

Die Untersuchung der Biotransformation von Benzaron führt zu vier erstmals beschriebenen monohydroxylierten Metaboliten; die genaue Lokalisierung der Hydroxylgruppen in diesen Metaboliten gelingt jedoch mit Hilfe der Massenspektrometrie nicht. Während die Strukturen der Metaboliten aus Rattengalle wegen interferrierender endogener Verbindungen nicht geklärt werden können, gelingt dies leicht mit Hilfe von Hepatozytensuspensionen.

Die Serumalbuminbindung von Lonazolac führt zu einer drastischen Verlangsamung seiner Biotransformation in isolierten Hepatozyten, wodurch das ungefähre Ausmaß des "first pass"-Effektes abgeschätzt werden kann. Vermutlich durch Adsorption in Retikuloendothelzellen liefert das Modellsystem der rezirkulierend perfundierten Rattenleber keine derartig eindeutigen Ergebnisse.

N-alkylsubstituierte 4,4-Diphenylpiperidine werden in Abhängigkeit vom Alkylrest biotransformiert. Vergleichende Untersuchungen an Rattenhepatozyten können das überlegene pharmakodynamische Verhalten des t-Butylderivates (Budipin) auf seine qualitativ und quantitativ unterschiedliche Biotransformation zurückführen.

9. LITERATUR

(1) B. Testa und P. Jenner, "Drug Metabolism, Chemical and Biochemical Aspects", Marcel Dekker, New York, 1976, S. 3-172

(2) D.V. Parke in "Concepts of Drug Metabolism" Part B, (Hg.: P. Jenner und B. Testa), Marcel Dekker, New York, 1981, S. 1-52

(3) R.T. Williams, "Detoxication Mechanisms", Chapman and Hall, London, 1959

(4) R.T. Williams, Fed. Proc. 26, 1029 (1967)

(5) B.B. Brodie, R.P. Maickel und W.R. Jondorf, Fed. Proc. 17, 1163 (1958

(6) B.B. Brodu, J.R. Gillette und B.N. LaDu, Ann. Rev. Biochem. 27, 427 (1958)

(7) J.R. Gillette, Progr. Drug Res. 6, 11 (1963)

(8) H.G. Mandel in "Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition" (Hg. B.N. LaDu, H.G. Mandel und E.L. Way), Williams & Wilkins, Baltimore, 1971, S. 149

(9) G.J. Mannering, in "Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition" (Hg. B.N. LaDu, H.G. Mandel und E.L. Way), Williams & Wilkins, Baltimore, 1971, S. 206

(10) W.F. Trager in "Concepts in Drug Metabolism", Part A (Hg.: P. Jenner und B. Testa), Marcel Dekker, New York, 1979, S. 177-209

(11) R. Ferreira, J. Theor. Biol. 39 665 (1973)

(12) R.W. Estabrook und J. Werringloer in "Microsomes and Drug Oxidations" (Hg.: V. Ullrich, J. Roots, A. Hildebrandt, R.W. Estabrook und A.H. Conney), Pergamon, Oxford, 1977, S. 748

(13) S. el Defrawy el Masry, G.M. Cohen und G.J. Mannering, Drug Metab. Dispos. 2, 267 (1974)

(14) H.L. Richardson und L. Cunnigham, Caner Res. 16, 450 (1956)

(15) H. Remmer, Naturwissenschaften 45, 189 (1958)

(16) A.H. Conney, Pharmacol. Rev. 19, 317 (1967)

(17) G.J. Mannering in "Selected Pharmacological Testing Methods" (Hg.: A. Burger), Marcel Dekker, New York, 1968, S. 51-119

(18) R. Kuntzman, Ann.Rev. Pharmacol. 9, 21 (1969)

(19) G.J. Mannering in "Handbook of Experimental Pharmacology" 28 (2) (Hg.: B.B. Brodie und J.R. Gillette), Springer, Berlin, 1971, S. 452-476

(20) M.W. Anders, Ann. Rev. Pharmacol. 11, 37 (1971)

(21) N.E. Sladek und G.J. Mannering, Mol. Pharmacol. 5, 186 (1969)

(22) M.W. Anders und G.J. Mannering, Mol. Pharmacol 2, 319 (1966)

(23) V. Ullrich und P. Kremers, Arch. Toxicol 39, 41 (1977)

(24) U. Frommer, V. Ullrich und S. Orenius, FEBS Lett. 41, 14 (1974)

(25) V. Ullrich, J. Schadelin und H. Staudinger, FEBS Symp. 16, 261 (1969)

(26) V. Ullrich, P. Weber und P. Wollenberg, Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 808 (1975)

(27) U. Frommer, V. Ullrich und H. Staudinger, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 903 (1970)

(28) M.D. Burke und R.T. Mayer, Drug Metab. Dispos. 3, 245 (1975)

(29) T. Fischbach und W. Lenk in "Microsomes and Drug Oxidations" (Hg.: V. Ullrich, I. Roots, A. Hildebrandt, R. Estabroo, und A.H. Conney), Pergamon, New York, 1977, S. 39-46

(30) H.G. Selander, D.M. Jerina und J.W. Daly, Arch. Biochem. Biophys. 168 309 (1975)

(31) M.D. Burke und J.W. Bridges, Xenobiotica 5, 357 (1975)

(32) V. Ullrich, U. Frommer und P. Weber, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 514 (1973)

(33) D.W. Nebert, J.R. Robinson, A. Niwa, K. Kumaki und A.P. Poland, J. Cell Physiol. 85, 393 (1975)

(34) D.W. Nebert und A.R. Boobis in "Biological Reactive Intermediates" (Hg.: D.J. Jallow, J.J. Kocsis, R. Snyder und H. Vainio), Plenum, New York, 1977, S. 125-145

(35) S.S. Thorgeirsson und D.W. Nebert, Advan. Cancer. Res. 25, 149 (1977)

(36) A.R. Boobis und D.W. Nebert in "Advances in Enzyme Regulation" (Hg.: G. Weber) Vol. 15, Pergamon, New York, 1977, S. 339-362

(37) D.W. Nebert, Biochimie, 60, 1019 (1978)

(38) D.W. Nebert in "Pharmacological Intervention in the Aging Process" (Hg.: J. Roberts, R.C. Adelman und V.J. Cristofalo), Plenum, New York, 1978, S 55-79

(39) D.W. Nebert und N.M. Nielson, CRC Critical Rev. Biochem. 6, 401 (1979)

(40) A.R. Boobis, D.W. Nebert und O. Pelkonen, Biochem. Pharmacol. 28, 111 (1979)

(41) G.Powis, R.E. Talcott und J.B. Schenkman, in "Microsomes and Drug Oxidations" (Hg.: V. Ullrich, J. Roots, A. Hildebrandt, R. Estabrook und A.H. Conney), Pergamon, New York, 1977, S. 127-35

(42) N.E. Sladek und G.J. Mannering, Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 668 (1966)

(43) S. Cha, Mol. Pharmacol. 4, 621 (1968)

(44) N.E. Sladek ubd G.J. Mannering, Mol. Pharmacol. 5, 174 (1969)

(45) A.P. Alvares und G.J. Mannering, Mol. Pharmacol. 6, 206 (1970)

(46) A. Rubin, T.R. Tephly und G.J. Mannering, Biochem. Pharmacol. 13, 1007 (1964)

(47) J.F. Henderson und P. Mazel, Biochem. Pharmacol. 13, 1471 (1964)

(48) N.E. Sladek, "Studies on the stimulation of drug metabolism by Phenobarbital and polycyclic hydrocarbons". Doktorarbeit, Universität Minnesota, 1966

(49) A.P. Alvares, G.R. Schilling und R. Kuntzman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 588 (1968)

(50) H.L. Gurtoo, T.C. Campbell, R.E. Webb und K.M. Plowman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 588 (1968)

(51) N.G. Zampaglione und G.J. Mannering, J. Pharmacol. Exp. Ther. 185, 676 (1973)

(52) D.S. Davies, P.L. Gigon und J.R. Gillette, Biochem. Pharmacol. 17, 1865 (1968)

(53) J.A. Castro und J.R. Gillette, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 426 (1967)

(54) J.B. Schenkman, I. Frey, H. Remmer und R.W. Estabrook, Mol. Pharmacol. 3, 516 (1967)

(55) T.C. Pederson und S.D. Aust, Biochem. Pharmacol. 19, 2221 (1970)

(56) F. Wada, H. Shimakawa, M. Takasugi, T. Kotake und Y. Sakamoto, J. Biochem. 64, 109 (1968)

(57) S.E. Lewis, C.F. Wilkinson und J.W. Ray, Biochem. Pharmacol. 16, 1195 (1967)

(58) P. Jenner und B. Testa in "Drug Metabolism Reviews" (Hg.: T.J. DiCarlo) Vol. 2, Marcel Dekker, New York, 1974, S. 117-84

(59) L.K. Low und N. Castagnoli, Jr., in "Annual Reports in Medicinal Chemistry" (Hg.: F.H. Clarke) Academic, New York, 1978, S. 304-15

(60) L.R. Pohl, S.D. Nelson, W.A. Garland und W.F. Trager, Biomed. Mass Spect. 2, 23 (1975)

(61) L.R. Pohl, S.D. Nelson, W.R. Porter, W.F. Trager, M.J. Fasco, F. D. Baker und J.W. Feuton II, Biochem. Pharmacol. 25, 2153 (1976)

(62) W.F. Trager in "Drug Metabolism Concepts" (Hg.: D.M. Jerina) Am. Chem. Soc. Symp. Series 44, Washington D.C., 1977, S. 81-98

(63) L.R. Pohl, W.R. Porter, W.F. Trager, M.J. Fasco und J.W. Fenton II, Biochem. Pharmacol. 26, 109 (1977)

(64) T. Omura und R. Sato, J. Biol. Chem. 237, 1375 (1962)

(65) D. Ryan, A.Y.H. Lu, S.West und W. Levin, J. Biol. Chem. 250, 2157 (1975)

(66) W. Levin und R. Kuntzman, J. Biol. Chem. 244, 3671 (1969)

(67) W. Levin und R. Kuntzman, Mol. Pharmacol. 5, 499 (1969)

(68) W. Levin, D. Ryan, R. Kuntzman und A.H. Conney, Mol. Pharmacol. 11, 190 (1975)

(69) U.A. Meyer und A.S. Marver, Science 171, 64 (1971)

(70) E. Jeffry, A. Kotake, R. el Azhary und G.J. Mannering in "Microsomes and Drug Oxidations" (Hg.: V. Ullrich, I. Roots, A. Hildebrandt, R.W. Estabrook und A.H. Conney), Pergamon, New York, 1976, S. 323-30

(71) E. Jeffry, A. Kotake, R. el Azhary und G.J. Mannering, Mol. Pharmacol. 13, 415 (1977)

(72) T. Yamono und Y. Ichikawa, Pharmacol. Ther., (A), 2, 673 (1978)

(73) Y. Imai in "Cytochrome P-450" (Hg.: R. Sato und T. Omura), Academic, New York, 1978, S. 37-72

(74) M.R. Franklin, Mol. Pharmacol. 8, 711 (1972)

(75) M.R. Franklin, Mol. Pharmacol. 8, 722 (1972)

(76) J.W. DePierre und L. Ernster, FEBS Lett. 55, 18 (1975)

(77) M.D. Chaplin und G.J. Mannering, Mol. Pharmacol. 6, 631 (1970)

(78) K. Takeshige, A. Ho und S. Minakami, J. Biochem. 72, 1361 (1972)

(79) F. DeMatteis in "Heme and Hemoproteins" (Hg.: F.De Matteis und W.N. Aldrige), Springer, New York, 1978, S. 95-127

(80) J.J. Brandshaw, M.R. Ziman und K.M. Ivanetich, Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 859 (1978)

(81) L. Deloria, J. Low und G.J. Mannering in "Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis" Vol II, (Hg.: M.J. Coon, A.H. Conney, R.W. Estabrook, H.V. Gelboin, J.R. Gillette und P.J.O'Brien), Academic, New York 1980, S. 861-864

(82) K.M. Ivanetich, J.A. Marsh, J.J. Brandshaw und L.S. Kaminsky in "Microsomes and Drug Oxidations" (Hg.: V. Ullrich, I. Roots, A. Hildebrandt, R. Estabrook und A.H. Conney), Pergamon, New York, 1977, S. 76-81

(83) D.Y. Cooper, H. Schleyer, O. Rosenthal, W. Lewin, A.Y.H. Lu, R. Kuntzman und A.H. Conney, Eur. J. Biochem. 74, 69 (1977)

(84) R.D. Gray, J. Biol. Chem. 253, 4364 (1978)

(85) H. Shigematsu, S. Yamano und H. Yoshimura, Arch. Biochem. Biophys. 173, 178 (1976)

(86) S. Kuwahara und G.J. Mannering in "Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis" Vol. II (Hg.: M.J. Coon, A.H. Conney, R.W. Estabrook, H.V. Gelboin, J.R. Gillette und P.J. O'Brien), Academic, New York, 1980, S. 973-976

(87) T. Yamano und T. Iizuka in "Cytochrome P-450" (Hg.: R. Sato und T. Omura), Academic, New York, 1978, S. 106-26

(88) D. W. Nebert und H. Kon, J. Biol. Chem. 248, 169 (1973)

(89) D.W. Nebert und J.R. Robinson, J. Biol. Chem. 248, 7637 (1973)

(90) H. Grasdalen, D. Backström, L.E.G. Ericksson, A. Ehrenberg, P. Moldeus, C. von Bahr und S. Orrenius, FEBS Lett. 60, 294 (1975)

(91) V. Ullrich und W. Duppel in "The Enzymes" Vol. 12 (Hg.: P. Boyer), Academic, New York, 1975, S. 253-97

(92) A.Y.H. Lu und M.J. Coon, J. Biol. Chem. 243, 1331 (1968)

(93) A.Y.H. Lu und W. Levin, Biochim. Biophys. Acta 344, 205 (1974)

(94) A.Y.H. Lu und S.B. West, Pharmacol. Ther., (A), 2 337 (1978)

(95) K. Comai und J.L. Gaylor, J. Biol. Chem. 248, 4947 (1973)

(96) A.Y.H. Lu, R. Kuntzman, S. West und A.H. Conney, Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 1200 (1971)

(97) F. Fujita, D.W. Shoeman und G.J. Mannering, J. Biol. Chem. 248, 2192 (1973)

(98) D. Ryan, A.Y.H. Lu, J. Kawalek, S.B. West und W. Levin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 1134 (1975)

(99) A.P. Alvares und P. Siekevitz, Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 923 (1973)

(100) D.Y. Bell und E. Hodgson, Gen. Pharmacol. 8, 121 (1977)

(101) D.A. Haugen, T.A. van de Hoeven und M.J. Coon, J. Biol. Chem. 250, 3567 (1975)

(102) M.J. Coon, D.P. Ballon, D.A. Haugen, S.O. Krezoski, G.D. Nordblom und R.E. White in "Microsomes and Drug Oxidations" (Hg.: V. Ullrich, I. Roots, A. Hildebrandt, R. Estabrook und A.H. Conney), Pergamon, New York, 1977, S. 82-94

(103) M.J. Coon, R.E. White, G.D. Nordblom, D.P. Ballon und F.P. Guengerich, Croatica Chem. Acta 49, 163 (1977)

(104) J.A. Gustaffsson und M. Ingelman-Sundberg, Eur. J. Biochem. 64, 35 (1976)

(105) E.F. Johnson und U. Müller-Eberhard, Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 644 (1977)

(106) E.F. Johnson und U. Müller-Eberhard, Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 652 (1977)

(107) D.E. Ryan, P.E. Thomas und W. Levin, Mol. Pharmacol. 13, 521 (1977)

(108) F.P. Guengerich, J. Biol. Chem. 252, 3970 (1977)

(109) Y. Imai, J. Biochem. 80, 267 (1976)

(110) M. Warner, M.V. LaMarca und A.H. Neims, Drug Metab. Dispos. 6, 353 (1978)

(111) A.F. Welton und S.D. Aust, Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 898 (1974)

(112) D.A. Haugen und M.J. Coon, J. Biol. Chem. 251, 7929 (1976)

(113) T.A. van der Hoeven, D.A. Haugen und M.J. Coon, Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 569 (1974)

(114) D.A. Haugen, M.J. Coon und D. W. Nebert, J. Biol. Chem. 251, 1817 (1976)

(115) E.F. Johnson und U. Müller-Eberhard, J. Biol. Chem. 252, 2839 (1977)

(116) M.-T. Huang, S.B. West und A.Y.H. Lu, J. Biol. Chem. 251, 4659 (1976)

(117) R.M. Philpot und E. Arinc, Mol. Pharmacol. 12, 483 (1976)

(118) P.E. Thomas, A.Y.H. Lu, D. Ryan, S.B. West, J. Kawalek und W. Levin, J. Biol. Chem. 251, 1385 (1976)

(119) W.L. Dean und M.J. Coon, J. Biol. Chem. 252, 3255 (1977)

(120) F.P. Guengerich, J. Biol. Chem. 253, 7931 (1978)

(121) G.J. Mannering in "Concepts in Drug Metabolism" Part B Drugs Pharm. Sci. 10, 53-166 (1981)

(122) T. Iyanagi und H.S. Mason, Biochemistry 12, 2297 (1973)

(123) Y. Yasukochi und B.S.S. Masters, J. Biol. Chem. 251, 5337 (1976)

(124) J.A. Knapp, J.D. Dignam und H.W. Strobel, J. Biol. Chem. 252, 437 (1977)

(125) J.C. Vermillon und M.J. Coon, J. Biol. Chem. 253, 2694 (1978)

(126) L. Sagan, J. Theoret. Biol. 14, 225 (1967)

(127) F.S. Mathews und P. Strittmatter, Proc. Nat. Acad. Sci., USA 68, 1042 (1971)

(128) B. Hagihara und E. Furuya, Pharmacol. Ther.,(A) 2, 537 (1978)

(129) A. Ho und R. Sato, J. Biol. Chem. 243, 4922 (1968)

(130) P.J. Flemming, H.A. Dailey, D. Corcoran und P. Strittmatter, J. Biol. Chem. 253 5369 (1978)

(131) N. Oshino, Pharmacol. Ther., (A) 2, 477 (1978)

(132) C.F. Strittmatter in "Haematin Enzymes", Vol. 2 (Hg.: J.E. Folk, R. Lemberg und R.K. Morton), Pergamon, New York, 1961, S. 461-473

(133) P. Strittmatter in "The Enzymes" (Hg.: P.D. Boyer, H.A. Lardy und K. Myrbäck), Academic, New York, 1963, S. 113-145

(134) L. Spatz und P. Strittmatter, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1042 (1971)

(135) L. Spatz und P. Strittmatter, J. Biol. Chem. 248, 793 (1973)

(136) K. Mihara und R. Sato, J. Biochem. 78, 1057 (1975)

(137) R.B. Mailman, L.G. Tate, K.E. Muse, L.B. Coons und Hodgson, Chem.-Biol. Interact. 10, 215 (1975)

(138) K.J. Netter und H.P. King, Xenobiotica 4, 549 (1974)

(139) G.J. Mannering, A. Kuahare und T. Omura, Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 476 (1974)

(140) J.R. Gillette, J.J. Kamm und H.A. Sasame, Mol. Pharmacol. 4, 541 (1968)

(141) J.R. Fouts und B.B. Brodie, J. Pharmacol. Exp. Ther. 119, 197 (1957)

(142) R. Kato, T. Oshima und A. Takanaka, Mol. Pharmacol. 5, 487 (1969)

(143) J.R. Gillette, Adv. Pharmacol. 4, 219 (1966)

(144) J.R. Gillette, Ann. N.Y. Acad. Sci. 160, 558 (1969)

(145) M. Mitchard, Xenobiotica 1, 469 (1971)

(146) H. Uehleke, Naturwiss. 50, 335 (1963)

(147) H. Uehleke und K. Nestel, Naunyn Schmiedbergs Arch. Pharmacol. 257, 151 (1967)

(148) M. Kiese, Pharmacol. Rev. 18, 1091 (1966)

(149) M.H. Bickel, Pharmacol. Rev. 21 325 (1969)

(150) P. Jenner, Xenobiotica 1, 399 (1971)

(151) J.W. Bridges, J.W. Gorrod und D.V. Parke (Hg.) "The Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules", Taylor & Francis, London 1972

(152) J.H. Weisburger und E.K. Weisburger, Pharmacol. Rev. 25, 1 (1973)

(153) J.W. Gorrod, Chem. Biol. Interact. 7, 289 (1973)

(154) F.F. Kadlubar, E.M. McKee und D.M. Ziegler, Arch. Biochem. Biophys., 156 46 (1972)

(155) J.A. Wittkop, R.A. Prough und D.J. Reed, Arch. Biochem. Biophys. 134, 308 (1969)

(156) D.V. Parke "The Chemistry of Foreign Compounds", Pergamon, Oxford, 1968

(157) A. Goldstein, L. Arnow und S.M. Kalman "Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology", Haper and Row, New York, 1969

(158) R.E. Billings, H.R. Sullivan und R.E. McMahon, J. Biol. Chem. 246, 3512 (1971)

(159) W. Dunger und G.F. Kahl, Naunyn Schmiedbergs Arch. Pharmacol. 267, 293 (1970)

(160) M. Morita, D.R. Feller und J.R. Gillette, Biochem. Pharmacol. 20, 217 (1971)

(161) G.J. Dutton in "Glucuronic Acid" (Hg.: G.J. Dutton), Academic, New York, 1966, S. 186

(162) B.B. Brodie und R.P. Maickel in "Proceedings of the First International Pharmacology Meeting", Vol. 6 (Hg.: B.B. Brodie und E.G. Erdös), Pergamon, London, 1962, S. 299

(163) B.B. Brodie, R.P. Maickel und W.R. Jondorf, Fed. Proc. 17, 1163 (1958)

(164) D. Robinson und R.T.Williams, Biochem. J. 68, 23P (1958)

(165) P.C. Hirom, J.R. Idle und P. Millburn in "Drug Metabolism: From Microbe to Man" (Hg.: D.V. Parke und R.L. Smith), Taylor and Francis, London, 1977, S. 299

(166) G.H. Lathe und M. Walker, Biochem. J. 70, 705 (1958)

(167) S.E.H. Archer, T. Scatcherd und W. Taylor, Biochem. J. 94, 778 (1965)

(168) J.S. Holcenberg und S.W. Rosen, Arch. Biochem. Biophys. 110, 551 (1965)

(169) H. Boström und B. Wengle, Acta Endocrinol. 56, 691 (1967)

(170) J.N. Smith in "Comparative Biochemistry", Vol. 6, (Hg.: M. Florkin und H.S. Mason), Academic, New York, 1964, S. 403

(171) H.P. Pan und J.R. Fouts, Drug Metab. Rev. 7, 1 (1978)

(172) J.N. Smith, Biochem. J. 60, 436 (1955)

(173) S. Bonchilloux und R. Roche, Bull. Soc. Chim. Biol. 37, 37 (1955)

(174) I.H. Goldberg und A. Delbrück, Fed. Proc. 18, 235 (1959)

(175) F. Lipmann, J. Biol. Chem. 160, 173 (1945)

(176) C.P. Sherwin und M. Helfand, J. Biol. Chem. 40, 17 (1919)

(177) F.W. Power, Proc. Soc, Exp. Biol. Med. 33, 598 (1936)

(178) J.B. Jepson, Biochem. J. 69, 22P (1958)

(179) R.Z. Patel und M.A. Crawford, Biochem. J. 89, 81P (1963)

(180) R.L. Smith und J. Caldwell in "Drug Metabolism: From Microbe to Man" (Hg.: D.V. Parke und R.L. Smith), Taylor & Francis, London 1977, S. 331

(181) B.C. Baldwin, D. Robinson und R.T. Williams, Biochem. J. 76, 595 (1960)

(182) J.W. Bridges, M.E. Evans, J.R. Idle, P. Millburn, F.O. Osiyemi, R.L. Smith und R.T. Williams, Xenobiotica 4, 645 (1974)

(183) M.O. James, R.L. Smith, R.T. Williams und M. Reichenberg, Proc. Roy. Soc., Ser. B 182, 25 (1972)

(184) P.L. Grover in "Drug Metabolism: From Microbe to Man" (Hg.: D.V. Parke und R.L. Smith), Taylor & Francis, London, 1977, S. 105

(185) U.A. Meyer und P.J. Meier, Schweiz. med. Wschr. 112, 666 (1982)

(186) E. Bachman , L. Goldberg und P. diGiacomo, Exp. Mol. Pathol. 12, 212 (1970)

(187) D.L. Cinti, P. Moldéus und J.B. Schenkman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 1028 (1972)

(188) M.H. Bickel, Arch. Biochem. Biophys. 148, 54 (1971)

(189) L.L. Miller in "Isolated Liver Perfusion and its Application" (Hg.: I. Bartosek, A. Guaitani und L.L. Miller), Raven, New York, 1973, S. 11-53

(190) N. Gerber, W.L. Weller, R. Lynn, R.E. Rango, B.J. Sweetman und M.T. Bush, J. Pharmacol. Exp. Ther. 178, 567 (1971)

(191) R.M. Thompson, J. Beghin, W.K. Fife und N. Gerber, Drug Metab. Dispos. 4, 349 (1976)

(192) J.Jonsson, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 18, 189 (1978)

(193) A. Raine, D.G. Shand und R. Wilkinson, Drug Metab. Dispos. 5, 179 (1977)

(194) K.S. Pang und J. R. Gillette, J. Pharmacol. Exp. Ther. 207, 178 (1978)

(195) T. Inaba, T. Umeda, L. Endrenyi, W.A. Mahon und W. Kalow, Biochem. Pharmacol. 27, 1151 (1978)

(196) M. Vore und M.T. Bush, J. Pharmacol. Exp. Ther. 212, 103 (1980)

(197) I. Bartosek, A. Guaitani, S. Garattini und I. Simonazzi, Biochem. Pharmacol. 23, 599 (1974)

(198) M.N. Berry und D.S. Friend, J. Cell. Biol. 43, 506 (1969)

(199) S.R. Wagle, Life Sci. 17, 827 (1975)

(200) S.R. Wagle, W.R. Ingebretsen, jr. und L. Sampson, Acta Diabetol. Lat. 12, 185 (1975)

(201) S.R. Wagle und W.R. Ingebretsen, Jr., Meth. Enzymol. 15, 579 (1975)

(202) J.R. Fry und J.W. Bridges in "Progress in Drug Metabolism", Vol. 2, John Wiley & Sons, London, 1977, S. 71-118

(203) R.E. McMahon, Ann.N.Y. Sci. 349, 46 (1980)

(204) R.G. Thurmann und F. Kauffman, Pharmacol. Rev. 31, 229 (1980)

(205) A.E. Sirica und H.C. Pitot, Pharmacol. Rev. 31, 205 (1980)

(206) R.E. Billings, R.E. McMahon, J. Ashmore und S.R. Wagle, Drug Metab. Dispos. 5, 518 (1977)

(207) P. Moldeus, R. Grundin, H. Vadi, S. Orrenius, Eur. J. Biochem. 46, 351 (1974)

(208) J.W. Sear und J.D. McGivan, Biochem. Pharmacol. 29, 248 (1980)

(209) D.J. Stewart und T. Inaba, Biochem. Pharmacol. 28, 461 (1979)

(210) J. S. Hayes und K. Brendel, Biochem. Pharmacol. 25, 1495 (1976)

(211) M. Hirata, J. Högberg, H. Thor und S. Orrenius, Acta Pharmacol. Toxicol. 41, 177 (1977)

(212) R.E. Billings, P.J. Murphy, R.E. McMahon und J.Ashmore, Biochem. Pharmacol. 27, 2525 (1978)

(213) C.A. Jones, B.P. Moore, G.M. Cohen, J.R. Fry und J.W. Bridges, Biochem. Pharmacol. 27, 693 (1978)

(214) A.R. Steward und J.L. Byard, Pharmacologist 23, 179 (1981)

(215) P. Wiebkin, J.R. Fry, C.A. Jones, R.K. Lowing und J.W. Bridges, Biochem. Pharmacol. 27, 1899 (1978)

(216) R.F. Siliciano, S. Margolis und P.S. Lietman, Biochem. Pharmacol. 27, 2759 (1978)

(217) D.J. Bates, A.B. Foster und M. Jarman, Biochem. Pharmacol. 30, 3055 (1981)

(218) A.I. Cederbaum und E. Dicker, Biochem. Pharmacol. 30, 3079 (1981)

(219) B. Andersson, D.P. Jones und S. Orrenius, Biochem. J. 184, 709 (1979)

(220) R.R. Erickson und J.L. Holtzman, Biochem. Pharmacol. 25, 1501 (1976)

(221) D.W. Sundheimer, Dissertation, University of Arizona, 1979

(222) A. Noda, K.-Y. Hsu, Y. Aso, K. Matsuyama, S. Iguchi und M. Hirata, J. Chromatogr. 230, 345 (1982)

(223) A. Poole und C. Urwin, Biochem. Pharmacol. 25, 281 (1976)

(224) J. Gwynn, J.R. Fry, J.W. Bridges, Biochem. Soc. Trans. 7, 117 (1979)

(225) A. Anne, P.A. Hals, B. Hansen und J. Aarbakke, Acta Pharmacol. Toxicol. 49, 58 (1981); Suppl. 1

(226) P. Moldéus, Biochem. Pharmacol. 27, 2859 (1978)

(227) S. McLean, Naunyn Schmiedbergs Arch. Pharmacol. 305, 173 (1978)

(228) T. Inaba, T. Umeda, W.A. Mahon, J. Ho und K.N. Jeejeebhoy, Life Sci. 16, 1227 (1975)

(229) E.-M. Suolinna, Drug Metab. Dispos. 8, 205 (1980)

(230) M. Jaffe, Ber. Dt. Chem. Ges. 34 2737 (1901)

(231) M. Jaffe, Ber. Dt. Chem. Ges. 35, 2891 (1902)

(232) J. Halberkam und F. Fretwurst, F. Z. Physiol. Chem. 283, 97 (1930)

(233) J. Halberkam und F. Fretwurst, Arg. Inst, Biol. Sau Paulo 11, 149 (1940)

(234) J. Halberkam und F. Fretwurst, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 285, 97 (1950)
M.J. Enklewitz, J. Pharmacol. 54, 100 (1935)
K. Pohle und H. Went, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 207, 203 (1949)

(235) B.B. Brodie und J. Axelrod, J. Pharmacol. Exp. Ther. 99, 171 (1950)

(236) B.N. La Du, L. Gaudette, N. Trousof und B.B. Brodie, J. Biol. Chem. 214, 741 (1955)

(237) F. Pechtold, Arzneim. Forschg. 14, 972 (1964)

(238) F.R. Preuss und K.M. Voigt, Naturwiss. 51, 537 (1964)

(239) B. Schneppel und K. Soehring, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 251, 109 (1965)

(240) R. Preuss und K.M. Voigt, Arzneim. Forschg. 15, 741 (1965)

(241) J.V. Dingell und P.W. D'Encarnacao, Pharmacologist 8, 181 (1966)

(242) T. Kammetani, K. Kigasawa, N. Ikari, T. Iwata, M. Saito und H. Yagi, Chem. Pharm. Bull. 15, 1305 (1967)

(243) E. Arrigoni, L. Manzo und P. Sarti, Boll. Soc. Hal. Biol. Sper. 43, 1461 (1967)

(245) T.E. Gram und J.R. Fouts, J. Pharmacol. Exp. Ther. 158, 317 (1967)

(246) J.B. Schenkman, J. Frey, H. Remmer und R.W. Estabrook, Mol. Pharmacol. 3, 516 (1967)

(247) G.Benzi, F. Berté, A. Crema und G.M. Frigo, J. Pharm. Sci. 56, 1349 (1967)

(248) F. Berté und G. Benzi, J. Pharm. Pharmacol. 19, 608 (1967)

(249) N.C. Banerju, G.E. Miller und C.M. Stowe, Toxicol. Appl. Pharmacol. 10, 596 (1967)

(250) J. Vecerkova, B. Kakac, B. Vecerek und M. Ledvina, Pharmazie 22, 30 (1967)

(251) R. Kato, A. Takanaka und K. Onoda, Jap. J. Pharmacol. 18, 516 (1968)

(252) B. Gradnik, Boll. Soc. Hal. Sper. 44, 1564 (1968)

(253) G. Benzi, F. Berté, A. Crema und E. Arrigoni, J. Pharm. Sci. 57, 1031 (1968)

(254) G. Benzi, F. Berté, A. Crema und E. Arrigoni, J. Pharm. Sci. 57, 1301 (1968)

(255) J.H. Dewaide und P.T. Henderson, Biochem. Pharmacol. 17, 1901 (1968)

(256) T.E. Gram. J.T. Wilson und J.R. Fouts, J. Pharmacol. Exp. Ther. 159, 172 (1968)

(257) W. Klinger, Arch. Intern. Pharmacodyn. 180, 309 (1969)

(258) E. Benzi, F. Berté, E. Arrigoni und L. Manzo, J. Pharm. Sci. 58, 885 (1969)

(259) W. Klinger, Biochem. Pharmacol. 18, 1559 (1969)

(260) E. Klug, Arzneim. Forschg. 20, 201 (1970)

(261) H. Yoshimura, H. Shimeno und T. Tsukamoto, Yakugaku Zasshi 90, 1406 (1970)

(262) E. Ackermann, Biochem. Pharmacol. 19, 1955 (1970)

(263) E. Klug, Arzneim. Forschg. 20, 201 (1970)

(264) H. Oehme und E. Schmid, Arzneim. Forschg. 22, 2115 (1972)

(265) R. Gradnik und L. Fleischmann, Pharm. Acta Helv. 48, 181 (1973)

(266) M.S. Gold und D.M. Ziegler, Xenobiotica 3, 179 (1973)

(267) R.G. Thurman und R. Scholz, Eur. J. Biochem. 38, 73 (1973)

(268) R. Scholz, W. Hansen und R.G. Thurman, Eur. J. Biochem. 38, 64 (1973)

(269) L. Fleischmann, Pharm. Acta Helv. 48, 192 (1973)

(270) B. Gradnik und L. Fleischmann, Pharm. Acta Helv. 48, 144 (1973)

(271) V.L. Armstrong, R.W. Niemeier und E. Bingham, Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 491 (1973)

(272) T. Koizumi, M. Ueda und S. Takada, Chem. Pharm. Bull. 22, 894, (1974)

(273) A.I. Archakov, I.I. Karuzina, V.N. Tveritinov und I.S. Kokareva, Biochem. Pharmacol. 23, 1053 (1974)

(274) S. Iguchi, T. Goromaru und A. Noda, Chem. Pharm. Bull. 23, 932 (1975)

(275) H. Niwa, N. Hikichi und H. Sasaki, J. Pharm. Soc. Japan 95, 1050 (1975)
A. Noda, T. Goromaru, N. Matsuyama und S. Igudi, Chem. Pharm. Bull. 24, 1502 (1976)

(276) G. Kampffmeyer, Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokin. 182 (1976)

(277) A. Noda, N. Tsubone, M. Mihara, T. Goromaru und S. Iguchi, Chem. Pharm. Bull. 24, 3229 (1976)

(278) T. Goromaru, A. Noda, K. Matsuyama und S. Iguchi, Chem. Pharm. Bull. 24, 1376 (1976)

(279) B.H. Lauterburg und J. Bircher, J. Pharm. Exp. Ther. 196, 501 (1976)

(280) T. Gorumaru, A. Noda, K. Matsuyama und S. Iguchi, Chem. Pharm. Bull. 24, 1376 (1976)

(281) H. Niwa und H. Sasaki, J. Pharm. Soc. Japan 96, 269 (1976)

(282) J. LaBar und J. Sander, Arzneim. Forschg. 26, 1340 (1976)

(283) P. Mascherpa, Bull. Soc. Ital. Biol. Sper. 52, 342 (1976)

(284) H.R. Dohmeier, H. Schmidt, R. Hauser und D. Neubert in "Rohe Pharmacokin. Prenatal. Perinat. Toxicol., Symp. Prenat. Dev." 3rd (Hg.: D. Neubert, H.J. Merker und H. Nau), Thieme, Stuttgart, 1978, S. 193-209

(285) A. DiNucci, P.L. Rugarli, B. Ferrini, A. Tarozzi, C. Gregotti und L. Manzo, Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokin. 179 (1979)

(286) A.G. Hildebrandt, I. Roots, G. Heinemeyer, S. Nigam und H. Helge, Symp. Med. Hoechst 14 (Induct. Drug Metab.), 615 (1979)

(287) D.J. Steward und T. Inaba, Biochem. Pharmacol. 28, 461 (1979)

(288) T. Goromaru, K. Matsuyama, A. Noda und S. Iguchi, Chem. Pharm. Bull. 27, 563 (1979)

(289) J. Pachecka, K. Krzywicka und W. Bicz, Pol. J. Pharmacol. Pharm. 31, 623 (1979)

(290) J. B. Houston und G.F. Lockwood, Brit. J. Pharmacol. 66, 429P (1979)

(291) A. Gescher und C. Raymount, Arch. Pharmacol. 313 Suppl., R52 (1980)

(292) J.M. Lasker, K. Sivarajah, R.P. Mason, B. Kalyanaraman, M.B. Abou-Donia und T.E. Eling, J. Biol. Chem. 256, 7764 (1981)

(293) H. Saito, S. Naminohira, T. Sakai, K. Ueno und H. Kitagawa, Res. Commun. Chem. Phathol. Pharmacol. 34, 141 (1981)

(294) T. Goromaru, T. Furuta, S. Baba, A. Noda und S. Iguchi, Chem. Pharm. Bull. 29, 1724 (1981)

(295) Y. Hachino, T. Matubara und B. Hagihara, Jap. J. Pharmacol. 31, 911 (1981)

(296) T. Tamura, N. Kuboyama und A. Fujii, Jap. J. Pharmacol. 31 Suppl., 211P (1981)

(297) K.-H. Beyer, Dt. Apotheker Zeitg. 121, 1868 (1981)

(298) A. Bast und J. Noordhoek, Biochem. Pharmacol. 30, 19 (1981)

(299) H. Sies, P. Graf und J.M. Estrela, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3358 (1981)

(300) S. Murray und D.S. Davies, Brit. J. Clin. Pharmacol. 11, 419P (1981)

(301) H. Junge, W. Hecker und W. Christ, Arch. Pharmacol. 316, Suppl., R4 (1981)

(302) T. Satoh, T. Igarashi, T. Hirota und H. Kitagawa, J. Pharmacobiodyn. 4, 516 (1981)

(303) G. Singh, K.W. Renton und N. Stebbing, Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 1256 (1982)

(304) P.L. Little und A.J. Ryan, Biochem. Pharmacol. 31, 1795 (1982)

(305) T. Shono, T. Noda und N. Oshino, J. Am. Chem. Soc. 104, 2639 (1982)

(306) A.N. Kotake, B.D. Schreider und J.R. Latts, Drug Metab. Dispos. 10, 251 (1982)

(307) S. Pfeifer, Pharmazie, 23, 225 (1968)

(308) D.E. Hathway (senior reporter), "Foreign Compound Metabolism in Mammals", Vol. 1, The Chemical Society, London, 1970, S. 144

(309) I. Bartosek, A. Guaitani, S. Garattini und I. Simonazzi, Biochem. Pharmacol. 23, 599 (1974)

(310) T. Shono, T. Noda und N. Oshino, Drug Metab. Dispos. 9, 481 (1981)

(311) T. Shono, T. Toda und N. Oshino, J. Am. Chem. Soc. 104, 2639 (1982)

(312) B.B. Wheals und I. Jane, Analyst (London), 102, 625 (1977)

(313) R.E. Majors, H.G. Barth und C.H. Lochmüller, Anal. Chem. 54, 323R (1982)

(314) R.K. Gilpin, L.A. Pachla und J.S. Ranweiler, Anal. Chem. 53, 142R (1981)

(315) M.A. Ebenson, Anal. Chem. 53, 214R (1981)

(316) H. Ko und E.N. Petzold in "GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents" Part 1 (Hg.: K. Tsuii und W. Morozowich), New York, Basel, 1978, S. 278-302

(317) Th. Kronbach und W. Voelter "The Vitamins" in "High Performance Column Liquid Chromatography in Biochemistry", (Hg.: A. Henschen, K.-P. Hupe, F. Lottspeich und W. Voelter), Verlag Chemie, Weinheim, im Druck

(318) W. Voelter, Th. Kronbach, K. Zech und R. Huber, J. Chromatogr. 239, 475 (1982)

(319) R. Huber, K. Zech, M. Wörz, Th. Kronbach und W. Voelter, Chromatographia, im Druck

(320) R.N. Reingold, M.F. Picciamo und E.G. Perkins, J. Chromatogr. 190, 237 (1980)

(321) J.N. Thompson und G. Hatina, J. Liq. Chromatogr. 2, 327 (1979)

(322) L.J. Hatam und H.J. Kayden, J. Lipid Res. 20, 639 (1979)

(323) K.Zech, "Biogenic Amines" in "High Performance Column Liquid Chromatography in Biochemistry" (Hg.: A. Henschen, K.-P. Hupe, F. Lottspeich und W. Voelter), Verlag Chemie, Weinheim, im Druck

(324) L.A. Pachla und P.T. Kissinger, Anal. Chem. 48, 364 (1976)

(325) K. Ogan, E. Katz und W. Slavin, J. Chromatogr. Sci, 16, 517 (1978)

(326) D. Ishii, K. Hibi, K. Asai, M. Nagaya, K. Mochizuki und Y. Mochida, J. Chromatogr. 156, 173 (1978)

(327) H.P.M. van Vliet, Th.C. Bootsman, R.W. Frei und U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. 185, 483 (1979)

(328) D.D. Koch und P.T. Kissinger, Anal. Chem. 52, 27 (1980)

(329) J. Lankelma und H. Poppe, J. Chromatogr. 149, 587 (1978)

(330) J.F.K. Huber und R.R. Becker, J. Chromatogr. 142, 765 (1977)

(331) R.P.W. Scott und P. Kucera, J. Chromatogr. 185, 27 (1979)

(332) R.J. Dolphin, F.W. Willmott, A.D. Mills und L.P.J. Hoogeveen, J. Chromatogr. 122, 259 (1976)

(333) F.F. Cantwell, Anal. Chem. 48, 1854 (1976)

(334) D.J. Timbic und P.G. Kenney, J.Food Sci. 42, 1590 (1977)

(335) G.J. De Jong, J. Chromatogr. 183, 203 (1980)

(336) J.C. Gfeller und M. Stockmeyer, J. Chromatogr. 198, 162 (1980)

(337) J.A. Apffel, T.V. Alfredson und R.E. Majors, J. Chromatogr. 206, 43 (1981)

(338) W. Roth, K. Beschke, R. Jauch, A. Zimmer und F.W. Koss, J. Chromatogr. 222, 13 (1981)

(339) M. Sato und K. Yagi, J. Chromatogr. 242, 185 (1982)

(340) M.S.F. Ross, J. Chromatogr. 141, 107 (1977)

(341) L.D. Mell jr., A.R. Dasler und A.B. Gustafson, J. Liq. Chromatogr. 1, 261 (1978)

(342) P. Lindroth und K. Mopper, Anal. Chem. 51, 1667 (1979)

(343) J.C. Gfeller, J.M. Hunen und J.P. Thevenin, Chromatographia 12, 368 (1979)

(344) J.C. Hodgin, J. Liq. Chromatogr. 2, 1047 (1979)

(345) K. Yamada, E. Kayama, Y. Aizawa, K. Oka und S. Hara, J. Chromatogr. 223, 176 (1981)

(346) B.R. Larsen und F.G. West, J. Chromatogr. Sci. 19, 259 (1981)

(347) B.N. Jones, S. Paabo und S. Stein, J. Liq. Chromatogr. 4, 565 (1981)

(348) T.P. Davis, C.W. Gehrke, jr., C.H. Williams, C.W. Gehrke und K.O. Gerhardt, J. Chromatogr. 228, 113 (1982)

(349) M.D. Ullman und R.H. McCluer, J. Lipid Res. 19, 910 (1978)

(350) K. Grob. jr., E. Grob und K. Grob, J. Chromatogr. 156, 1 (1978)

(351) K. Grob, G. Grob und K. Grob. jr., J. Chromatogr. 219, 13 (1981)

(352) L. Fontaine, M. Grand, J. Chabert, E. Szarvasi und M. Bayssat, Chim. Ther., 6, 463 (1968)

(353) L. Fontaine, M. Grand, E. Szarvasi und M. Bayssat, Chem. Ther. 7, 39 (1969)

(354) A. Meynaud, M. Grand und L. Fontaine, Arzneim. Forschg. 23, 1431 (1973)

(355) R.R. Brodie, L.F. Chasseaud, T. Taylor, J.O. Hunter und P.J. Ciclitira, J. Chromatogr. 164, 534 (1979)

(356) Th. Kronbach und W. Voelter, Abstracts of the 8th European Workshop on Drug Metabolism, 5.-9. Sept. (1982), Sart Tilman, Belgien, 1982

(357) H. Elgass, A. Maute, R. Martin und S. George, Labor-Praxis, 6, 2, (April 1982)

(358) H. Elgass, persönliche Mitteilung

(359) R. Huber, K. Zech, M. Wörz, Th. Kronbach und W. Voelter, Chromatographia, im Druck,

(360) W.W. Oppelt, M. Zange, W.E. Ross und H. Remmer, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1, 43 (1970)

(361) I. Roots, S.Nigam, S. Gramatzki, G. Heinemeyer und A.G. Hildebrandt, Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. 313, 175 (1980)

(362) W.C. Govier, J. Pharmacol. Exp. Ther. 150, 305 (1965)

(363) K.J.N. Hartiala und T. Tehro, Nature 205, 809 (1965)

(364) Th. Kronbach, Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1980

(365) L. Lemberger, J. Pharm. Sci. 61, 1690 (1972)

(366) D. Banauch, W. Brümmer, W. Ebeling, A. Metz, H. Rindfrey, H. Lang, K. Leybold und W. Rick, . Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 13, 101 (1975)

(367) A. Teuscher und R. Richterich, Schweiz. med. Wschr. 101, 345 und 390 (1971)

(368) A.L. Lehninger, Biochemie, Verlag Chemie, Weinheim, 1979, S. 517 ff.

DANKSAGUNG

Prof. Dr. K. Klemm, Dr. E. Ludwig, Dr. K. Zech, Dr. W.A. Simon, Dr. E. Sturm, Priv.-Doz. Dr. Chr. Schudt und Dr. W. Bohnenkamp danke ich herzlich für viele Diskussionsbeiträge und Anregungen beim Anfertigen der Arbeit. Frau M. Eisele, Herrn B. Kinder und Frau A. Eggert danke ich für ihre Hilfen bei Zellpräparationen und Analytik. Dr. E. Sturm und Herrn A. Junker danke ich für die Anfertigung der Massenspektren, Frau U. Bühler danke ich für die Anfertigung des Manuskriptes.

Herrn Prof. U.A. Meyer danke ich für die Überlassung von Bufuralol und von Humanmikrosomen zur Untersuchung des Aminopyrin-Metabolismus.

Folgenden Firmen bin ich für die Überlassung von Referenzsubstanzen zu Dank verpflichtet: Byk Gulden Lomberg GmbH, Konstanz; Hoechst AG, Frankfurt; Sanol-Schwarz, Monheim. Der Fa. Gynkotek, München sei für die leihweise Überlassung eines automatischen Probenaufgebers gedankt. Die Fa. Hewlett-Packard, Böblingen stellte zur Strukturaufklärung der Aminopyrin-Metaboliten einen Diodenarray-Detektor zur Verfügung, der sich als wertvolles Hilfsmittel erwies; auch ihr gilt mein Dank.

Schließlich sei an dieser Selle all denjenigen gedankt, die auf irgendeine Art zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 21.11.1952 in Schwenningen/Neckar geboren und wuchs in Königsfeld im Schwarzwald auf, wo ich von 1959-64 die Volksschule und von 1964-72 das Zinzendorfgymnasium besuchte. Im Frühjahr 1972 legte ich dort das Abitur ab und immatrikulierte mich zum Wintersemester 1972/73 im Fach Chemie an der Universität Tübingen, wo ich im Frühjahr 1976 das Vordiplom abschloß und im Herbst 1979 die Diplom-Hauptprüfung ablegte. Während meines Studiums arbeitete ich als wissenschafltiche Hilfskraft überwiegend auf dem Gebiet der Gaschromatographie am Institut für Organische Chemie und am Institut für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Tübingen. Von Dezember 1979 bis November 1980 entstand meine Diplomarbeit in den Forschungslaboratorien der Byk Gulden Lomberg GmbH, Konstanz und am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen. Von Februar 1981 bis Dezember 1982 entstand die vorliegende Arbeit ebenfalls wie die Diplomarbeit unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Wolfgang Voelter in der Abteilung für physikalische Biochemie des Instituts für Physiologische Chemie der Universität Tübingen und in den Forschungslaboratorien der Byk Gulden Lomberg GmbH, Konstanz.

Meine akademischen Lehrer waren:
E. Bayer, E. Breitmaier, H. Frank, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, G. Jung, S. Kemmler-Sack, G. Kortüm, U. Kunze, D. Krug, I.P. Lorenz, H. Mauser, E. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, F. Rex, W. Rüdorff, A. Rieker, W. Rundel, M. Sauerbier, M. Schramm, F.F. Seelig, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil.

Druck und Gesamtherstellung:
H. Hummel, Bismarckstr. 116/6
D-7410 Reutlingen, Tel. 0 71 21/4 53 77